

RNA-Bindestudien und funktionelle Analysen der chloroplastidären RNA-Bindeproteine CP29A und CP31A in *Arabidopsis thaliana*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biochemikerin Christiane Kupsch

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Stefan Hecht, Ph.D.

Gutachter: 1. Prof. Dr. Christian Schmitz-Linneweber
 2. Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Grimm
 3. Prof. Dr. Sacha Baginsky

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2013

Zusammenfassung

cpRNPs (chloroplastidäre Ribonukleoproteine) sind kernkodierte RNA-Bindeproteine, die jeweils zwei RRM (*RNA recognition motif*)-Domänen besitzen und in die Chloroplasten höherer Landpflanzen importiert werden. Die Mitwirkung dieser Proteine innerhalb multipler Reifungsprozesse plastidärer mRNAs *in vitro*, ihre bemerkenswert hohe Abundanz sowie die Beeinflussung ihrer Funktion durch lichtabhängige posttranslationale Modifizierungen weisen auf eine bedeutende Rolle der cpRNPs in der Regulierung der plastidären Genexpression hin. In dieser Arbeit erfolgte erstmals eine Analyse der *in vivo* bestehenden Interaktionen zwischen cpRNPs und RNA in stromalen Extrakten isolierter Chloroplasten mittels RIP-Chip-Analysen. Es konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der chloroplastidären mRNA-Spezies sowohl mit CP31A als auch mit CP29A kopräzipitiert. Neben der mehrheitlichen Überlappung der RNA-Interaktionen konnten spezifische Präferenzen von CP29A und CP31A für bestimmte Transkripte identifiziert werden.

Um Einblicke in die molekularen Funktionen von CP29A und CP31A zu erhalten, wurden *cp29a*- und *cp31a*- Einzel- und Doppelmutanten hinsichtlich der Akkumulation, sowie des Spleiß- und Edierungsstatus ausgewählter plastidärer mRNAs untersucht. Da unter Standard-Wachstumsbedingungen lediglich wenige milde Defekte innerhalb der mRNA-Reifung in diesen Mutanten identifiziert wurden, erfolgten weitere Analysen unter Kältestress-Bedingungen, die zu einer Induktion der CP29A-Expression und zu einem Ausbleichen junger Blattgewebe in *cp29a*- und *cp31a*- Einzel- und Doppelmutanten führten. In den chlorotischen Geweben der Mutanten konnten dramatische Reduktionen plastidärer Proteine sowie PEP-abhängig transkribierter mRNAs detektiert werden. Darüber hinaus wurden für einige Transkripte Prozessierungsdefekte beobachtet: Die Reifung der 23S-rRNA findet in *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten nur eingeschränkt statt. In *cp31a*-Mutanten sind außerdem die Prozessierung der *ycf3*-RNA sowie die Spaltung eines polycistronischen *rpl33*-Vorläufers gestört. In *cp29a*-Mutanten ist unter anderem die Prozessierung der *rpoC1*- und der *ycf3*-mRNA defizitär.

Schlagworte: Chloroplast, RNA-Bindeproteine, Kältestress, cpRNPs

Abstract

cpRNPs (chloroplast ribonucleoproteins) are nuclear encoded RNA-binding proteins, which contain two RRM (RNA recognition motif) domains and reside within the chloroplasts of higher land plant species. They are involved in plastid mRNA accumulation and processing *in vitro*. Their involvement in multiple steps of mRNA maturation and their remarkable abundance together with their regulation via posttranslational modifications identified the cpRNPs as potential central regulators of chloroplast gene expression.

This work investigated the *in vivo* interactions of CP29A and CP31A from Arabidopsis with RNA in isolated chloroplasts via RIP-Chip. In this approach the association of both proteins with the majority of plastid mRNA species could be shown. While the interaction profiles of CP29A and CP31A were largely overlapping, also specific preferences for some transcripts were detected.

To gain insights in the molecular functions of CP29A and CP31A, null mutants for one or both cpRNPs were analyzed for mRNA accumulation, splicing and editing. Since only few mild mRNA maturation defects were detected at standard growth conditions, analyses at cold stress were performed. Cold stress leads to an increase in CP29A expression and in both *cp29a*- and *cp31a* single- and double mutants a bleaching of young leaf tissue was observed. The chlorotic tissues showed a strong decrease in plastid protein accumulation accompanied by reduced levels of PEP-dependent transcripts. In addition some processing defects were observed: The maturation of the 23S-rRNA was reduced in *cp29a*- and *cp31a* mutants. In addition the processing of the *ycf3*-mRNA and a polycistronic *rpl33* transcript were defective in *cp31a* mutants. In *cp29a* mutants processing defects within the *rpoC1*- and the *ycf3*-mRNA were detected.

Keywords: chloroplast, RNA binding proteins, cold stress, cpRNPs

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	I
ABSTRACT	II
INHALTSVERZEICHNIS	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Der Chloroplast als genetisches System.....	1
1.1.1 Entstehung der Plastiden durch Endosymbiose	1
1.1.2 Organisation des Plastidengenoms	2
1.2 Die plastidäre Genexpression	2
1.2.1 Transkription.....	2
1.2.2 posttranskriptionelle RNA-Prozessierung	3
1.2.2.1 End-Prozessierung	3
1.2.2.2 Prozessierung von Intronsequenzen (Spleißen)	4
1.2.2.3 C → U Edierung.....	5
1.2.3 Translation	6
1.2.4 Posttranslationale Modifikationen	6
1.3 RNA-bindende Proteine in Chloroplasten von <i>Arabidopsis thaliana</i>	7
1.3.1 PPR-Proteine.....	7
1.3.2 Proteine mit RRM-Domäne(n)	8
1.3.2.1 plastidäre RRM-Proteine, die nicht zur cpRNP-Familie gehören	9
1.3.2.2 cpRNPs (chloroplastidäre Ribonukleoproteine)	10
1.4 Zielstellung	12
2 MATERIALIEN UND METHODEN	13
2.1 Materialien.....	13
2.1.1 Pflanzenmaterial	13
2.1.2 Chemikalien und Standardlösungen	13
2.1.3 Molekularbiologische Reagenzien.....	14
2.1.4 Antikörper	14
2.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	14
2.2 Methoden	14
2.2.1 Pflanzenanzucht	14
2.2.2 Genotypisierung	14

2.2.3 Stroma Extraktion	15
2.2.4 Ko-Immunpräzipitation (CoIP).....	16
2.2.5 Extraktion genomischer DNA.....	16
2.2.6 RNA Extraktion	17
2.2.7 Überprüfung der RNA Qualität und Quantität.....	17
2.2.8 cDNA Synthese.....	17
2.2.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	18
2.2.10 Northern Analysen	18
2.2.10.1 Denaturierende RNA Gelelektrophorese	18
2.2.10.2 Northern Transfer	18
2.2.10.3 Herstellung radioaktiver RNA-Sonden.....	18
2.2.10.4 Hybridisierung	19
2.2.10.5 Detektion	19
2.2.11 Herstellung spezifischer Antikörper	19
2.2.11.1 anti-CP31A.....	19
2.2.11.2 anti-CP29A.....	20
2.2.12 RIP-Chip Analysen	20
2.2.12.1 Herstellung eines Plastom überspannenden Microarrays (tiling array)	20
2.2.12.2 Herstellung eines Oligonukleotid-Microarrays	20
2.2.12.3 RNA Extraktion	21
2.2.12.4 Fluoreszenzmarkierung der RNA	21
2.2.12.5 Hybridisierung der Microarrays.....	21
2.2.12.6 Auswertung der Microarrays	22
2.2.13 Dot-Blot Analysen	22
2.2.14 Western Analysen	23
2.2.15 Quantitative <i>real time</i> (qRT-) PCR.....	24
2.2.16 <i>Run-on</i> Transkription.....	24
2.2.17 Edierungsanalysen	24
3 ERGEBNISSE	26
3.1 Das Fehlen von CP31A und CP29A führt nicht zu makroskopischen Defekten	26
3.2 Identifizierung der RNA-Interaktionspartner von CP29A und CP31A.....	27
3.2.1 Ko-Immunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern	27
3.2.2 CP29A und CP31A interagieren mit multiplen RNAs	28
3.2.3 CP29A und CP31A interagieren mit multiplen Bereichen eines Transkripts.....	31

3.3 In <i>cp31a</i> -Mutanten sind <i>ndh</i> -Transkripte, insbesondere <i>ndhF</i> reduziert	32
3.4 CP31A ist in die Stabilisierung der gespleißten <i>ycf3</i> - und der <i>ndhB</i> -mRNA involviert	33
3.5 Unter Kältestress entwickeltes Gewebe ist in <i>cp29a</i> - und <i>cp31a</i> -Mutanten chlorotisch	35
3.6 Die Expression von CP29A wird durch Kältestress induziert.....	38
3.7 Photosynthetische Proteine sind im bleichen Gewebe der <i>cpRNP</i> -Mutanten reduziert.	39
3.8 PEP-abhängige Transkripte sind in den chlorotischen Blattabschnitten reduziert.....	41
3.9 RNA-Prozessierungsdefekte in <i>cp29a</i> - und <i>cp31a</i> -Mutanten unter Kältestress	41
3.9.1 <i>rpoC1</i> wird in <i>cp29a</i> -Mutanten nicht korrekt prozessiert.....	41
3.9.2 Die Prozessierung der <i>ycf3</i> -mRNA ist unter Kältestress defizitär	43
3.9.3 In <i>cp29a</i> - und <i>cp31a</i> -Mutanten ist das Spleißen des <i>ndhB</i> -Introns reduziert.....	43
3.9.4 <i>rpl33</i> ist in <i>cp31a</i> -Mutanten unter Kältestress reduziert.....	45
3.9.5 Die Prozessierung der 23S- und der 16S-rRNA ist in <i>cp29a</i> - und <i>cp31a</i> -Mutanten fehlerhaft.....	45
3.10 Die Rate der plastidären Transkription ist in <i>cp29a</i> -Mutanten nicht beeinflusst	47
3.11 CP29A und CP31A sind kältespezifische Edierungsfaktoren.....	48
4 DISKUSSION.....	50
4.1 CP29A und CP31A sind mit ungewöhnlich vielen RNAs, vornehmlich mRNAs, assoziiert.....	50
4.2 Die RNA-Interaktionsprofile von CP29A und CP31A zeigen hohe Ähnlichkeit	51
4.3 CP31A interagiert mit einem Großteil des plastidären mRNA-Pools, ist jedoch nicht (allein) verantwortlich für dessen Stabilisierung.....	53
4.4 CP31A ist unter Standard-Wachstumsbedingungen an der Stabilisierung weniger, spezifischer Transkripte beteiligt.....	54
4.5 CP29A und CP31A vermitteln Kältetoleranz in jungen Geweben.....	54
4.6 Kältestress führt zu rRNA-Prozessierungsdefekten in <i>cp29a</i> - und <i>cp31a</i> -Mutanten.....	56
4.7 CP29A und CP31A sind unter Kältestress an multiplen mRNA-Reifungsprozessen beteiligt.....	57
4.8 cpRNPs sind plastidäre Analoga der nukleären hnRNPs	61
4.9 Modell für die Funktionsweise der cpRNPs.....	63
LITERATURVERZEICHNIS	66
ANHANG 1	79
ANHANG 2	96
ABKÜRZUNGEN	98

DANKSAGUNG	102
SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	103

1 Einleitung

1.1 Der Chloroplast als genetisches System

Pflanzenzellen besitzen in der Regel drei DNA-haltige Organellen. Neben den in eukaryotischen Zellen ubiquitär vorhandenen Mitochondrien und dem Zellkern, sind in Pflanzenzellen die sogenannten Plastiden zu finden, welche die Möglichkeit für eine autotrophe Ernährung durch Photosynthese bergen. Photosynthetisch aktive Plastiden werden aufgrund ihrer grünen Farbe als Chloroplasten bezeichnet.

1.1.1 Entstehung der Plastiden durch Endosymbiose

Die Endosymbiontentheorie besagt, dass sich Mitochondrien und Plastiden aus ehemals frei lebenden Prokaryoten entwickelt haben. Mitochondrien stammen dabei von α -Proteobakterien, Plastiden von Vorläufern der Cyanobakterien ab, welche vor 2,5 - 1,5 Milliarden Jahren durch serielle endosymbiotische Ereignisse in eukaryotische Zellen integriert wurden (Margulis, 1970; Kutschera und Niklas, 2004; McFadden, 2001). Die Plastiden der Rot- und Grünalgen, sowie der aus Grünalgen hervorgegangenen Landpflanzen sind durch primäre Endosymbiosen, d.h. durch die direkte Aufnahme eines Eubakteriums durch eine eukaryotische Zelle, entstanden. Dahingegen sind z.B. Braunalgen oder Kryptophyte durch sekundäre Endosymbiosen, also durch die Aufnahme photosynthetisch aktiver Protisten entstanden, und besitzen deshalb, anstelle einer Doppelmembran, drei bis vier Hüllmembranen (Gray, 1993).

Im Laufe der Jahrtausende sind die genetischen Systeme verschiedenen Ursprungs zu einer gut koordinierten Funktionseinheit verschmolzen. Ein Großteil der ursprünglich bakteriellen Gene wurde in den eukaryotischen Zellkern übertragen, redundante Gene wurden entfernt. Die Produkte dieser transferierten Gene sowie viele eukaryotische Genprodukte werden posttranslational in die Organellen transportiert, um dort ihre (ursprüngliche) Funktion ausüben (z.B. Gray, 1993). Die Integration der Organellen ging auch mit Veränderungen ihrer Genomstruktur einher: Im Gegensatz zu ihren prokaryotischen Vorfahren ist in Chloroplasten ein gehäuftes Auftreten von Intronsequenzen und Edierungsstellen zu finden. Der daraus resultierende Bedarf entsprechender Prozessierungskomplexe wurde koevolutionär durch kernkodierte Faktoren, vor allem RNA-Bindeproteine, die posttranslational in die Plastiden lokalisieren, gedeckt (s. 1.2.2).

1.1.2 Organisation des Plastidengenoms

Das Chloroplastengenom liegt meist in Form eines zirkulären, doppelsträngigen Moleküls mit einer Größe von 120 Kilobasen (kb) bis 160 kb vor (Palmer, 1985). Einige Grünalgen besitzen allerdings deutlich größere Genome von bis zu 2000 kb (Palmer, 1985). Die Organisation des Plastoms verschiedener Spezies ist variabel; allen Angiospermen ist jedoch das Auftreten zweier asymmetrisch angeordneter inverser Sequenzwiederholungen (*inverted repeats*) gemein. Alle in diesem Bereich befindlichen Sequenzen, welche mit wenigen Ausnahmen die rRNA Gene umfassen, liegen also in zwei Kopien vor. Diese *inverted repeats* teilen das Plastidenchromosom in einen großen und einen kleineren nicht wiederholten Sequenzbereich (LSC = *large single copy region* und SSC = *small single copy region*) (Palmer, 1985; Sugiura, 1992; Sato, 1999). Die Anordnung der Gene innerhalb des Plastoms ist zwischen verschiedenen Spezies sehr variabel (Palmer, 1985).

In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, die in dieser Arbeit verwendet wurde, besteht das Plastom aus 154478 Basenpaaren (bp), welche 87 Gene, die für Proteine kodieren, sowie vier rRNA- und 37 tRNA-Gene enthalten (Sato, 1999).

1.2 Die plastidäre Genexpression

Die Genexpression in Plastiden umfasst neben Transkription und Translation eine Reihe posttranskriptionaler Modifikationen, welche Charakteristika eukaryotischer Organismen aufweisen. Im folgenden Abschnitt werden die zentralen Schritte der plastidären Genexpression, zusammen mit Beispielen für die Beteiligung kernkodierter Proteine eukaryotischen Ursprungs, erläutert.

1.2.1 Transkription

Die plastidäre Transkription wird von zwei RNA-Polymerasen verschiedener Herkunft ausgeführt (Hajdukiewicz et al., 1997; Allison et al., 1996; Link, 1996; Mullet, 1993). Die sogenannte PEP (plastidär kodierte plastidäre RNA-Polymerase; *plastid encoded plastid RNA-polymerase*) ist hauptsächlich für die Transkription der Gene zuständig, die für Proteine des Photosyntheseapparats kodieren (*psb*-, *psa*-, *atp*- Gene und andere). Bei der PEP handelt es sich um ein multimeres Enzym, dessen Untereinheiten ausschließlich in den Plastiden kodiert liegen. Die Funktionsfähigkeit der PEP wird allerdings durch die Interaktion mit verschiedenen im Kern kodierten Sigma-Faktoren beeinflusst und reguliert (Chi et al., 2010; Schweer et al., 2009; Hajdukiewicz et al., 1997; Link, 1996).

Die sogenannte NEP (nukleär kodierte plastidäre RNA-Polymerase, *nuclear encoded plastid RNA-polymerase*) wird posttranslational in die Plastiden transportiert und transkribiert dort die sogenannten Haushaltsgene, zu denen die Gene der ribosomalen Proteine (*rps*-, *rpl*-), einer Untereinheit der Carboxytransferase der Acetyl-CoA-Carboxylase (*accD*) und die PEP-Gene (*rpo*-) gehören. Besonders in der frühen Chloroplastenentwicklung spielt die NEP eine übergeordnete Rolle, da die Expression der PEP von ihrer Aktivität abhängig ist (Hajdukiewicz et al., 1997; Baumgartner et al., 1993; Mullet, 1993).

1.2.2 posttranskriptionelle RNA-Prozessierung

In Chloroplasten spielt die Regulation der Genexpression auf transkriptioneller Ebene, also die Produktion von höheren oder geringeren Transkriptmengen, als Anpassung an variable äußere Bedingungen eine eher subalterne Rolle (Deng und Gruissem et al., 1987; Gruissem et al., 1988; Klaff und Gruissem, 1991). Entscheidend sind dagegen posttranskriptionelle Regulationen, wie Stabilisierung oder Degradation der synthetisierten RNAs, bzw. variable Effektivität von Reifungsschritten, welche nukleolytische Schnitte polycistronischer Vorläufer-Transkripte, das Herausschneiden nichtkodierender Intronsequenzen, die Verkürzung von RNA-Enden und die C→U Edierung umfassen (Barkan und Goldschmidt-Clermont, 2000).

1.2.2.1 End-Prozessierung

Die Prozessierung polycistronischer Vorläufertranskripte in monocistronische RNAs, sowie die Verkürzung von 3'- und 5'-Enden erfolgt in Chloroplasten durch kernkodierte Endo- und Exoribonukleasen. Ein typisches Merkmal plastidärer mRNAs ist eine Stamm-Schleifen-Struktur innerhalb des 3'-nichttranslatierten Bereiches, welche das reife Ende der mRNA, vermutlich durch die Inhibierung von Exonukleasen, definiert (Stern und Gruissem, 1987).

Das Zuschneiden der 3' Enden plastidärer RNAs bis zu diesen Sekundärstrukturen erfolgt, soweit bekannt, durch zwei verschiedene Exoribonukleasen: Die 3' - 5' Exoribonuklease RNR1 ist an der Reifung der 3'-Enden der 5S-, 16S- und der 23S-rRNA beteiligt (Bollenbach et al., 2005). Die Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase) besitzt ebenfalls eine 3' - 5' Exoribonuklease-Aktivität und ist essentiell für die Ausbildung reifer 23S-rRNA-, *psbA*- und *rbcL* mRNA-3'-Enden (Hayes et al., 1996; Walter et al., 2002).

5'-Enden entsprechen entweder dem Transkriptionsstartpunkt (primäre 5'-Enden) oder entstehen sekundär durch endo- oder exonukleolytische Prozessierung. Ein Kandidat für 5'-3'-exonukleolytischen Abbau von RNA im Chloroplasten ist die in *Bacillus subtilis* entdeckte

und ursprünglich als reine Endonuklease beschriebene RNase J. Mathy et al. konnten 2007 aber nachweisen, dass dieses Enzym in *B. subtilis* ebenfalls eine 5' - 3' Exoribonuklease-Aktivität besitzt. In *Zea mays* schützt die Bindung eines PPR (*pentatricope repeat*)-Proteins an einen Sequenzbereich, in dem die 3'- und 5'-Enden der kodierenden Bereiche zweier plastidärer Gene überlappen vor exonukleolytischer Degradation durch RNR1, PNPase und RNaseJ (PPR10, Pfalz et al., 2009).

Endonukleolytische Schritte werden nach heutigem Wissensstand von sechs verschiedenen Enzymen ausgeführt (Übersicht in Stern et al., 2010), die wiederum durch unzählige kernkodierte Proteinfaktoren regulativ beeinflusst werden können. So kann beispielsweise PPR5 in *Z. mays* den endonukleolytischen Abbau ungespleißter *trnG*-tRNA inhibieren (Beick et al., 2008). HCF152, ein weiteres PPR-Protein ist in *A. thaliana* an einem endonukleolytischen Schnitt zwischen der *psbH*- und der *petB*-mRNA beteiligt (Meierhoff et al., 2003). Neben den PPR-Proteinen, die hochspezifisch mit einem oder wenigen definierten Sequenzmotiven interagieren (Pfalz et al., 2009; Beik et al., 2008), sind auch cpRNPs, die mit vielen verschiedenen mRNA assoziiert sind, *in vitro* an der Generierung diverser reifer mRNA-Enden beteiligt (Nakamura et al., 2001; Schuster und Gruissem, 1991; Hayes et al., 1996).

1.2.2.2 Prozessierung von Intronsequenzen (Spleißen)

Die Chloroplasten höherer Landpflanzen besitzen ca. 20 sogenannte Gruppe II Introns und ein Gruppe I Intron, welches innerhalb des *trnL* Gens liegt (Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007). Diese Gruppen unterscheiden sich grundlegend sowohl in ihren primären Sequenzen als auch in ihren Sekundärstrukturen. Gruppe II Introns sind größer als Gruppe I Introns und besitzen eine höhere strukturelle Variabilität (Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007; Bonen and Vogel 2001). Introns beider Gruppen sind *in vitro* in der Lage sich durch Ausbildung bestimmter Sekundärstrukturen ohne die Anwesenheit zusätzlicher Faktoren selbst auszuschneiden (*self-splicing*). *In vivo* wird dafür allerdings ein komplexes Zusammenspiel zumeist kernkodierter Proteine benötigt (Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007; Bonen and Vogel 2001). PPR4, ein PPR-Protein mit RRM-Domäne ist beispielsweise am trans-Spleißprozess der *rps12*-mRNA in *Z. mays* beteiligt (Schmitz-Linneweber et al., 2006); das PPR-Protein OTP51 ist essentiell für das Spleißen des zweiten Introns der *ycf3*-mRNA in *A. thaliana* (De Longevialle et al., 2008). Sowohl in *Z. mays* als auch in *A. thaliana* wurden drei Proteine, welche sogenannte CRM (*chloroplast RNA splicing and ribosome maturation*)-Domänen besitzen, identifiziert, die in beiden Spezies in unterschiedlich arrangierten

Komplexen für korrektes Spleißen von insgesamt zehn Introns (in Mais) oder zwölf Introns (in Arabidopsis) verantwortlich sind (CRS1, CAF1 und CAF2; zusammengefasst in Asakura und Barkan, 2006). Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit belegt Funktionen des ungewöhnlich kurzen PPR-Proteins THA8 im Spleißen des Introns 2 der *yef3*-mRNA und der tRNA *trnA* in *Z. mays* und *A. thaliana* (Khrouchtchova et al. 2012).

1.2.2.3 C→U Edierung

Ein weiteres typisches Merkmal plastidärer mRNA ist die Existenz von Edierungsstellen, an denen Cytosine zu Uridinen durch Deaminierung umgewandelt werden (Gott und Emeson, 2000; Knoop, 2010; Schmitz-Linneweber und Barkan, 2007). Ein Fehlen der Edierung an diesen Stellen führt meist zu einer Veränderung von Aminosäuren wie Serin, Prolin oder Histidin, die essentiell für die Struktur und damit für die Funktionstüchtigkeit der resultierenden Proteine sind (Tillich et al, 2006; Tillich et al, 2005; Tsudzuki et al., 2001).

Im Gegensatz zu Mitochondrien in denen 500 - 1000 C→U Edierungsstellen auftreten (Gott und Emeson, 2000), sind in Chloroplasten 20 - 50 solcher Cytosine zu finden (Castandet und Araya, 2011); im Plastom von *A. thaliana* wurden 34 Edierungsstellen identifiziert (Chateigner-Boutin und Small, 2007).

Noch immer ist die Identität der zuständigen Deaminase nicht mit Sicherheit geklärt, es wurden jedoch zahlreiche kernkodierte Faktoren, vornehmlich PPR-Proteine, identifiziert, deren Fehlen zu einer Eliminierung oder einer Reduktion der Edierungseffizienz spezifischer Cytosine führt (z.B. CLB19 [*rpoA*- und *clpP*-Edierung], Chateigner-Boutin et al., 2008; CRR4 [Edierung von *ndhD-1*], Kotera et al., 2005;; YS1 [*rpoB*-Edierung], Zhou, 2009; CRR22 und CRR28, Okuda, 2009). Viele der in die mRNA-Edierung involvierten PPR-Proteine besitzen eine sogenannte DYW-Domäne (benannt nach einer für diese Domäne typischen Sequenzabfolge von Aspartat, Thyrosin und Tryptophan), welche hypothetisch in der Lage ist die Deaminierung selbst auszuführen (Rüdinger et al., 2011 und 2012). Die sogenannte DYW-Domäne ähnelt auf struktureller, sowie auf Sequenzebene Cytidinaminasen, die in Tieren und Pilzen für C→U Edierung verantwortlich sind (Salone, 2007) und besitzt *in vitro* eine Endonuklease-Aktivität (Nakamura and Sugita, 2008). Da jedoch auch PPR-Proteine der E (*extended*)- Subklasse, die keine DYW-Domäne besitzen, als essentiell für Edierungsprozesse beschrieben wurden (Kotera et al., 2005; Okuda et al., 2007; Chateigner-Boutin et al., 2008), wird darüber spekuliert, dass E-Domänen Protein-Protein-Interaktionen begünstigen und ein Edierungsenzym rekrutieren.

Neben diversen PPR-Proteinen ist in *Nicotiana tabacum* das RNA-bindende Protein CP31,

welches zur Proteinfamilie der cpRNPs (chloroplastidäre Ribonukleoproteine) gehört, an der Edierung zweier mRNAs (*ndhB* und *petL*) beteiligt (Hirose und Sugiura, 2001). Das homologe Arabidopsis-Protein CP31A ist an der Edierung von insgesamt 16 Cytosinen in Chloroplasten beteiligt (Tillich et al., 2009).

1.2.3 Translation

Die plastidäre Translation entspricht im Wesentlichen der prokaryotischen Proteinexpression und wird von 70S Ribosomen durchgeführt, deren kleine und große Untereinheiten sich jeweils aus plastidär- und kernkodierten Proteinkomponenten zusammensetzen (Kozak, 1983). Die ribosomalen RNA-Komponenten sowie alle tRNAs, bis auf *trnR(ACG)* (Sato, 1999) sind dagegen im Chloroplastengenom kodiert.

Ein Merkmal der prokaryotischen Translation ist das Auftreten konservierter Ribosom-Bindestellen, sogenannter Shine-Dalgarno (SD) Sequenzen in mRNA 5'-UTRs, die eine komplementäre Sequenz innerhalb des 3'-Endes der 16S-rRNA binden (Kozak, 1983). In Chloroplasten treten diese ebenfalls in Erscheinung und können die Translationseffizienz der entsprechenden mRNA steigern (z.B. Hirose et al., 1998; Mayfield et al., 1994). 37 von insgesamt 41 in Tabak untersuchte mRNAs wiesen SD-ähnliche Sequenzen auf (Ruf und Kössel, 1988). Jedoch wurden sowohl in *Chlamydomonas reinhardtii* als auch in Bakterien Hinweise auf einen alternativen SD-unabhängigen Mechanismus der Translationsinitiation gefunden, der wahrscheinlich auch von Chloroplasten adaptiert wurde (Fargo et al., 1998; Scharff et al., 2011).

In *E. coli* wurden drei Initiationsfaktoren, vier Elongationsfaktoren und vier Terminations- oder *release*-Faktoren der Translation identifiziert. Für jeden dieser generellen Translationsfaktoren konnte ein Homolog in *C.reinhardtii* identifiziert werden, was zeigt, dass sich die prokaryotische und die plastidäre Translationsmaschinerie sehr ähnlich sind (Manuell, 2004).

Neben den generellen Translationsfaktoren gibt es eine Vielzahl weiterer kernkodierter Proteinkomponenten, welche die Translationseffizienz beeinflussen können. Zum Beispiel sind in *C. reinhardtii* kernkodierte RNA-Bindeproteine an der Translationsinitiation der *psbA*-mRNA (RB47, Yohn et al., 1998) und der *petA*-mRNA (TCA1, Wostrikoff, 2001) beteiligt.

1.2.4 Posttranslationale Modifikationen

Oft können Proteine posttranslational modifiziert werden, z.B. um Strukturveränderungen zu erreichen, welche wiederum die Funktion des Proteins/Enzyms beeinflussen können. Die

häufigste Modifikation in eukaryotischen Zellen ist die Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren (meist Serine und Threonine). Im Zytosol existiert eine hohe Vielfalt verschiedener Kinasen (Enzyme, die in der Lage sind Phosphatgruppen ATP-abhängig zu übertragen), die in Reihe geschaltet sind und unter diversen Stressbedingungen Phosphorylierungskaskaden auslösen, an deren Ende (ebenfalls durch Phosphorylierung) die Aktivitäten von Transkriptionsfaktoren beeinflusst und somit spezifische Stressantworten der Zelle reguliert werden (z.B. Teige et al., 2004; Jonak et al., 2002).

Auch in Chloroplasten gibt es Kinasen. Ein prominentes Beispiel ist die Casein Kinase II (CK II), die ein großes Substratspektrum besitzt, darunter Mitglieder der cpRNP-Familie (Reiland et al., 2009; Lisitsky und Schuster, 1995), sowie STN7, eine weitere Kinase, die wiederum die mobilen Lichtsammelkomplexe des Photosystems II (LHC II) phosphorylieren und damit ihre Translokation zum Photosystem I bewirken kann (Pfannschmidt et al., 2009).

1.3 RNA-bindende Proteine in Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana*

Wie bereits aus dem vorangegangenen Abschnitt hervorgeht, sind an allen Schritten der plastidären Genexpression kernkodierte RNA-Bindeproteine beteiligt (Abb. 1). Ihre Bindungseigenschaften beruhen auf bestimmten Domänen, die, basierend auf den Parametern Struktur, Sequenz und Ladung mit Ribonukleinsäure-Molekülen interagieren. Im folgenden Abschnitt werden die beiden für diese Arbeit relevanten Proteinfamilien und ihre charakteristischen RNA-Bindedomänen genauer beschrieben.

1.3.1 PPR-Proteine

PPR (*pentatricope repeat*) -Proteine sind durch vielfache Wiederholungen eines 35 Aminosäuren umfassenden Sequenzabschnitts charakterisiert, die in antiparallelen Helices angeordnet sind (Small und Peeters, 2000). Neben diesen Repetitionen besitzen einige PPR-Proteine weitere C-terminale Domänen (siehe auch 1.2.2.3; Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Für alle bisher näher untersuchten *ppr*-Mutanten konnten spezifische Defekte innerhalb multipler Schritte des RNA-Metabolismus identifiziert werden, inklusive RNA-Stabilität (z.B. *ppr2*, *pgr3*), RNA-Spleißen (*ppr4*, *ppr5*, *otp43*), RNA-Edierung (z.B. *crr4*, *crr21*, *clb19*), intercistronische Spaltung von RNA (*hcf152*, *crr2*), sowie Translationsinitiation (*cps1*) (zusammengefasst in Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Analysen der RNA-Bindungsaktivitäten von PPRs *in vivo* ergaben hochspezifische Interaktionen mit einem oder wenigen Transkripten (Pfalz et al., 2009 [PPR10]; Beick et al.,

2008 [PPR5]; Schmitz-Linnebeber et al., 2006 [PPR4]).

Die hohe Spezifität der PPRs, sowie ihre Vielfalt (mehr als 450 Mitglieder in Arabidopsis; Schmitz-Linneweber und Small, 2008), führte zu der Annahme, dass sie als Spezifikationsfaktoren für Enzyme dienen könnten, die wiederum RNA-Prozessierungs-Mechanismen in Gang setzen (Abb. 1; Schmitz- Linneweber und Small, 2008).

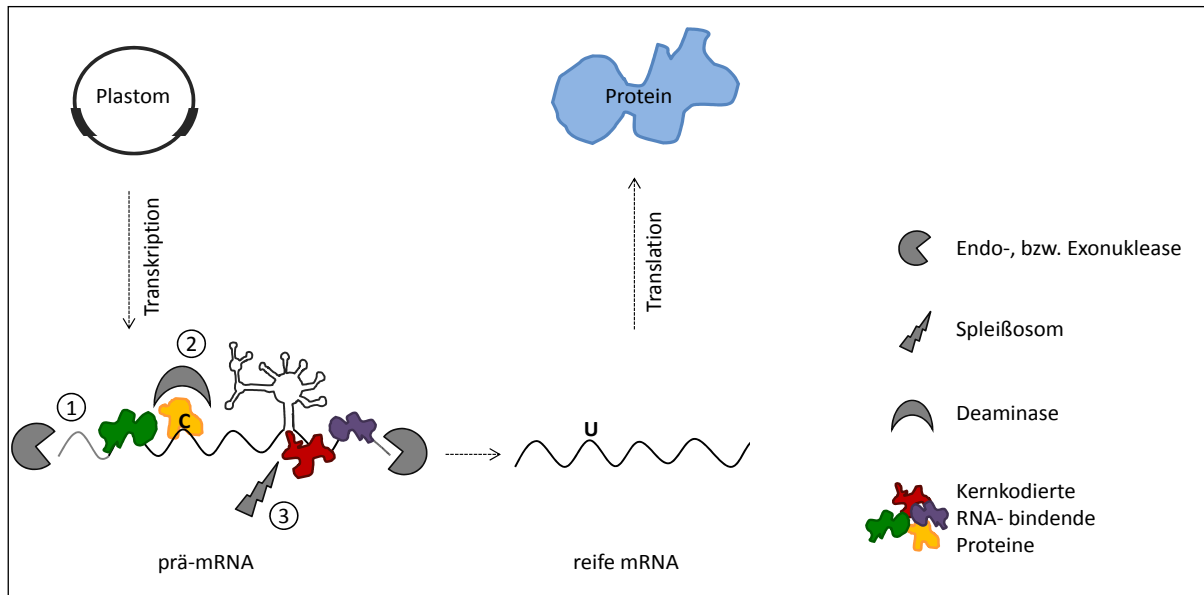


Abbildung 1 Posttranskriptionelle Prozessierungen chloroplastidärer mRNA. Die verschiedenen Prozessierungsschritte (1) Endprozessierung durch Endo- und Exonukleasen, (2) C → U Edierung unter Beteiligung einer Deaminase und (3) Intron-Spleißen durch das Spleißosom erfordern die Beteiligung weiterer kernkodierter RNA-bindender Proteine, die selbst keine enzymatischen Aktivitäten besitzen. Zu diesen gehören unter anderem PPR-Proteine, Proteine mit CRM-Domäne und cpRNPs.

1.3.2 Proteine mit RRM-Domäne(n)

Die RRM (*RNA recognition motif*)-Domäne ist das häufigste RNA-Bindemotiv in eukaryotischen Zellen: z. B. enthalten 0,5 - 1% aller im menschlichen Genom kodierten Proteine ein oder mehrere RRM-Domänen (Lunde et al., 2007); im Arabidopsis-Genom sind 196 RRM-haltige Proteine kodiert (Lorkovic und Barta, 2002). Die RRM-Domäne ist durch eine ca. 90 Aminosäuren umfassende Konsensus-Sequenz gekennzeichnet, welche zwei besonders konservierte Sequenzabschnitte, das acht AS lange RNP1-, sowie das 6 AS lange RNP2-Motiv, enthält. Die charakteristische Struktur der RRM-Domäne wird durch vier antiparallel angeordnete β -Faltblätter und zwei anliegende α -Helices definiert. Die Struktur dieser Bindung ist bereits für viele RRM-RNA-Komplexe mit Hilfe von Röntgen- oder NMR-Kristallographie ermittelt worden (Benoit et al., 2010; Maris et al., 2005; Schellenberg et al., 2006; Yang et al., 2011). Aus diesen Daten konnte ein allgemeines Modell für die RRM-

RNA-Bindung extrahiert werden: Die Wechselwirkung einer einzelnen RRM-Domäne mit RNA erfolgt durch die Interaktion zweier konservierter aromatischer Aminosäuren eines β -Faltblatts innerhalb des RNP1-Motivs, sowie einer weiteren aromatischen Seitenkette innerhalb eines RNP2- β -Faltblatts mit zwei benachbarten Ribonukleotiden. Durch die Beteiligung nicht-konservierter Aminosäuren an der RNA-Bindung (zwischen verschiedenen RRM-Domänen oder zwischen RNP1 und RNP2 innerhalb einer RRM-Domäne), sowie durch die Kombination mehrerer RRM-Domänen innerhalb eines Proteins können jedoch auch längere RNA-Abschnitte gebunden werden (Maris et al., 2005; Price, 1998). Außerdem können dadurch die Affinität und die Sequenzspezifität der Bindung erhöht werden (Lunde et al., 2007; Maris et al., 2005). Die RRM-Domäne ist keine exklusive RNA-Bindedomäne, sondern ist darüber hinaus (z.B. im Spleißosom) in der Lage Protein-Protein-Interaktionen zu vermitteln (Maris et al., 2005; Price, 1998). Die hohe Variabilität der Anzahl und Anordnung von RRM-Domänen, sowie deren Kombination mit weiteren RNA- oder Protein-bindenden Domänen gehen mit einem breiten Funktionsspektrum RRM-haltiger Proteine einher. Dieses umfasst im Nukleus unter anderem Polyadenylierung, Spleißprozesse, mRNA-Stabilisierung, sowie RNA-Export (zusammengefasst in Lorkovic und Barta, 2002).

Neben RRM-Proteinen, die ihre Funktion im nukleoplasmatischen Raum ausüben, sind einige in den Chloroplasten lokalisiert.

1.3.2.1 plastidäre RRM-Proteine, die nicht zur cpRNP-Familie gehören

Neben Mitgliedern der cpRNP-Familie (s. 1.3.2.2) wurden 13 weitere RRM-Proteine im Genom von *A. thaliana* identifiziert, welche ein Transitpeptid besitzen, das ihre Lokalisation in die Plastiden wahrscheinlich macht (zusammengefasst in Ruwe et al., 2011). Eines von zwei bereits näher untersuchten plastidären RRM-Proteinen ist das Poly-A-bindende Protein PAB7, das vier RRM-Domänen besitzt. Für den Import des Proteins in Chloroplasten spricht neben der Existenz eines C-terminalen Kern-Export-Signals seine Identifizierung in Proteom-Analysen von Arabidopsis Chloroplasten (Belostotsky et al., 2003; Ni et al., 2010). Die Funktion von PAB7 in Chloroplasten ist bisher unklar. Denkbar wäre jedoch eine Involvierung in mRNA-Degradationsprozesse, da Polyadenylierung in Chloroplasten in der Regel ihren Abbau und nicht wie im Nukleus ihre Stabilisierung bewirkt (Kudla et al., 1996; Schuster et al., 1999).

Ebenfalls näher untersucht ist das PPR-Protein PPR4, das neben der PPR-Domäne eine N-terminale RRM-Domäne besitzt. PPR4 interagiert *in vivo* mit der *rps12*-mRNA und ist am trans-Spleißprozess des ersten *rps12*-Introns beteiligt. Dabei werden zwei an verschiedenen

Positionen des Plastoms kodierte Abschnitte des *rps12*- Introns zunächst zusammengeführt und anschließend ausgeschnitten (Schmitz-Linneweber et al., 2006).

1.3.2.2 cpRNPs (chloroplastidäre Ribonukleoproteine)

cpRNPs wurden zum ersten Mal aus der löslichen Proteinfraction isolierter Tabak-Chloroplasten in einer Affinitätschromatographie mit einzelsträngiger DNA extrahiert (Li und Sugiura, 1990), besitzen aber eine deutlich höhere Affinität zu RNA (Li und Sugiura, 1991). Diese Proteine sind durch eine N-terminale saure Domäne, gefolgt von zwei RRM-Domänen, die durch einen kurzen nicht konservierten Sequenzabschnitt verbunden sind, gekennzeichnet. Ein N-terminales Transitpeptid garantiert den Transport dieser kernkodierten Proteine in die Chloroplasten und wird nach dem Import abgespalten. In Tabak gibt es fünf verschiedene cpRNPs, die ihren molekularen Massen (28 - 33 kD) entsprechend benannt und anhand von Sequenzähnlichkeiten in drei Gruppen eingeteilt wurden: Gruppe I (cp28 und cp31), Gruppe II (cp29A und cp29B) und Gruppe III (cp33). Während die RRM-Domänen eher konserviert sind, sind die sauren Domänen der verschiedenen Proteine hinsichtlich ihrer Länge, sowie ihres Gehalts an sauren Aminosäuren sehr variabel (Li und Sugiura, 1990; Li et al., 1991; Ohta et al., 1995; Abb. 2). cpRNPs wurden in vielen weiteren Pflanzenspezies, wie Mais (Cook und Walker, 1992), Spinat (Schuster und Gruissem, 1991; Hayes et al., 1996), Gerste (Churin et al., 1999) und Reis (Kleffmann et al., 2007) beschrieben. In *A. thaliana* konnten insgesamt 10 Vertreter der cpRNP-Familie identifiziert werden (Ohta et al., 1999; Ruwe et al., 2011).

cpRNPs sind äußerst abundante Proteine: Eine Analyse ihrer Abundanz im Stroma von Tabak-Chloroplasten zeigte, dass ihre Anzahl ungefähr 1/10 der RuBisCO-Moleküle beträgt (Nakamura et al., 2001). Die Menge aller mRNA-Moleküle in einem Chloroplasten (ca. 14000 *psbA*- Moleküle) ist weitaus geringer als die der untersuchten cpRNPs (ca. 10^5 Moleküle; Nakamura et al., 2001).

In Immun-Präzipitationen von Tabak-cpRNPs konnten *rbcL*, *petD*, sowie mehr als 90% der im Stroma befindlichen *psbA*-mRNA detektiert werden. Darüber hinaus befanden sich in diesen Präzipitaten geringe Anteile der intron-haltigen tRNAs *trnL*(UAA) und *trnG*(UCC). Dagegen kopräzipitierten die ribosomale 23S RNA, sowie *trnF*(GAA), eine tRNA, die kein Intron enthält, nicht mit Tabak-cpRNPs (Nakamura et al., 1999; Nakamura et al., 2001). Solche Präferenzen konnten ebenfalls für verschiedene Homooligonukleotide identifiziert werden: Tabak-cpRNPs, sowie das Spinat-cpRNP 28RNP binden mit deutlich höherer Affinität Poly(G)- und Poly(U)-Nukleotide, während Poly(A) und Poly(C) lediglich schwach

mit diesen Proteinen assoziieren (Li und Sugiura, 1991; Lisitsky et al., 1995). Eine Analyse der an der RNA-Bindung beteiligten Domänen an Hand verschiedener Deletionsmutanten belegte einen positiven Effekt der sauren Domäne auf die Affinität zu RNA. Die partielle oder gänzliche Deletion von RRM-Domänen, bzw. RNP-Motiven führte stets zu einer Verminderung der Fähigkeit des Proteins mit RNA zu interagieren (Lisitsky et al., 1994). Für einige cpRNPs konnten darüber hinaus posttranslationale Modifizierungen identifiziert werden, die nachweislich die RNA-Protein-Interaktion beeinflussen können. Die Spinat-cpRNPs 28RNP und 24RNP, sowie p34 werden von plastidären Kinasen phosphoryliert. Diese Modifizierungen führten zu einer Verminderung der Affinität zu RNA im Falle von 28RNP und zu einer Verschiebung bevorzugt gebundener Transkripte im Falle von 24RNP *in vitro* (Kanekatsu et al., 1993; Lisitsky und Schuster, 1995; Loza-Tavera et al., 2006). Phosphorylierte Serine wurden außerdem in den Arabidopsis-cpRNPs CP31A, CP29A, CP29B und CP33B identifiziert (Reiland et al., 2009; Baginsky und Gruissem, 2009); CP29A und CP29B werden zudem im Lauf der lichtabhängigen Pflanzenentwicklung N-terminal acetyliert (Wang et al., 2006). Eine phosphorylierte Form des RNP29 aus Reis wird ebenfalls lichtabhängig induziert (Kleffmann et al., 2006).

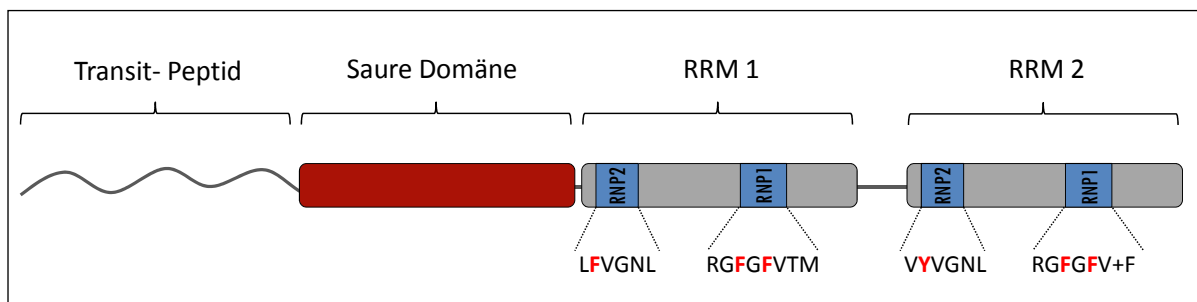


Abbildung 2 Allgemeine Struktur eines cpRNPs mit einem N-terminalen Chloroplasten-Importsignal (Transit-Peptid), einer Domäne, in der die sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure akkumulieren (Saure Domäne) und zwei RRM-Domänen, die jeweils zwei in die RNA-Erkennung involvierte konservierte Abschnitte (RNP1 und RNP2) enthalten. Die Konsensus-Sequenzen von RNP1 (6 AS) und RNP2 (8 AS) der beiden RRM-Domänen der *A.thaliana* cpRNP-Familie sind unten dargestellt. Die für die RNA- Erkennung essentiellen aromatischen Aminosäuren (F = Phenylalanin; Y = Tyrosin) sind rot hervorgehoben.

Funktionelle Analysen von cpRNPs beschränkten sich bisher zum großen Teil auf *in vitro*-Experimente. Eine Depletion von Tabak-cpRNPs aus stromalen Extrakten führte zu einer verringerten Halbwertszeit einer synthetischen *psbA*-mRNA, sowie einer erhöhten Effizienz der 3'-Prozessierung einer synthetischen *petD*-mRNA (Nakamura et al., 2001). Ähnliche Depletionsexperimente eines rekombinanten Spinat-cpRNP (RNP28) führte ebenfalls zu

verminderter 3'-End-Prozessierung von vier *in vitro* synthetisierten mRNAs (Schuster und Grissem, 1991; Hayes et al., 1996). Ein Mitglied der cpRNP-Familie aus Avocado (PARBP33) ist außerdem in der Lage die Spaltung eines dimeren ASBVd (*avocado sunblotch viroid*) Transkripts *in vitro* zu stimulieren (Daròs und Flores, 2002). Auch eine Beteiligung von cpRNPs an der C→U-mRNA-Edierung in Chloroplasten ist bereits belegt: Das Tabak-cpRNP cp31 induziert die Edierung synthetischer *ndhB*- und *psbL*-mRNAs *in vitro* (Hirose et al., 2001). CP31A ist *in vivo* an der Prozessierung von 16 Edierungsstellen in Arabidopsis-Chloroplasten beteiligt (Tillich et al., 2009).

1.4 Zielstellung

Bisherige funktionelle Analysen sowie Bindestudien von cpRNPs weisen auf eine zentrale Rolle dieser Proteine innerhalb multipler Prozessierungsschritte sowie der Stabilisierung plastidärer Transkripte hin. Allerdings basieren diese Erkenntnisse fast ausschließlich auf *in vitro* erhobenen Daten. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher die *in vivo* bestehenden Interaktionen der Arabidopsis-cpRNPs CP29A und CP31A mit plastidären Transkripten durch *Microarray*-Analysen der mit diesen Proteinen kopräzipitierenden RNAs (RIP-Chip) identifiziert werden. Anhand molekularbiologischer Analysen von *cp29a*- und *cp31a*-Nullmutanten sollte weiterhin der Einfluss von CP29A und CP31A auf die Akkumulation und die Prozessierung plastidärer mRNA *in vivo* entschlüsselt werden.

Da die Expression von cpRNPs abhängig von biotischen und abiotischen Faktoren variiert, sollten darüber hinaus die Effekte der auf die cpRNP-Expression induzierend wirkenden Stressfaktoren Licht und Kälte auf die unter Standard-Wachstumsbedingungen phänotypisch unauffälligen *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten, sowie *cp29a* x *cp31a*-Doppelmutanten untersucht werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Pflanzenmaterial

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurde *A.thaliana* des Ökotyps Columbia-0 (Col-0) verwendet. Transgene Linien wurden von ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*), GABI (Genomanalyse im biologischen System Pflanze) oder NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Center*) bezogen. *cp31a*- und *cp31b*- Null-Mutanten wurden freundlicherweise von Dr. Michael Tillich zur Verfügung gestellt. Alle in dieser Arbeit verwendeten transgenen Arabidopsis-Linien sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1 Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten Mutanten

Name der Mutante	Art der Mutation	Transgene Linie	Betroffenes Gen
<i>cp29a-1</i>	T-DNA- Insertion	SALK_003066	At3g53460
<i>cp29a-6</i>	T-DNA- Insertion	001G06	At3g53460
<i>cchl</i>	C→T Substitution	SALK_074622.44.90.x	At5g13630
<i>cp31a-1</i>	T-DNA- Insertion	SALK_109613	At4g24770
<i>cp31a-3</i>	T-DNA- Insertion	SAIL_258_h02	At4g24770
<i>cp31b-4</i>	T-DNA- Insertion	WiscDsLox383H9	At5g50250

2.1.2 Chemikalien und Standardlösungen

Soweit im Folgenden nicht anders beschrieben, wurden alle verwendeten Chemikalien von den Anbietern Roth, SIGMA, Bio-Rad und Invitrogen bezogen.

Alle wässrigen Lösungen wurden mit zweifach destilliertem H₂O angesetzt.

Standardlösungen, deren Zusammensetzung nicht im Text beschrieben ist, sind hier aufgeführt:

TBST

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

0,1% Tween20

TBE

89 mM Tris

89 mM Borsäure

20 mM EDTA

TAE

40 mM Tris-Acetat (pH 8,0)

1 mM EDTA (pH 8,0)

2.1.3 Molekularbiologische Reagenzien

Alle verwendeten Enzyme wurden von Fermentas und NEB, Oligonukleotide von SIGMA und Eurofins MWG Operon, Radionukleotide von Perkin Elmer und Hartmann Analytics, DNA-, RNA- und Protein-Größenstandards von Fermentas bezogen.

2.1.4 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper gegen die Untereinheiten der Photosynthesekomplex-Untereinheiten AtpA, D1, PsaD und PetD, sowie der anti-CP29A-Antikörper wurden von Agrisera bezogen. Der anti-CP31A-Antikörper wurde durch den „Pineda-Antikörper-Service“ synthetisiert.

2.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Zentrifugationen wurden, sofern im Text nicht anders vermerkt, mit Heraeus BIOFUGE® FRESCO-Tischzentrifugen (Thermo Scientific) durchgeführt.

PCR-Analysen erfolgten mit Geräten der Firma BioRad (C 1000™ Thermal Cycler), MJ Research (PTC-200 Peltier Thermal Cycler) und der Firma Biometra® (T3000 Thermocycler). Eine vollständige Liste aller Unternehmen, von denen Materialien bezogen wurden, befindet sich im Anhang (Anhang 1, Tab. 1).

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht

Die Anzucht der Arabidopsis-Pflanzen erfolgte in Pflanzenkammern mit 16 h Licht ($140 - 180 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) und 8 h Dunkelheit bei 23 °C auf Erde (Einheitserde® Classic Profi Substrat), welche zu einem Drittel mit Vermiculite (Nestaan) oder Quarzsand (Körnung: 3 mm - 5 mm) gemischt wurde. Kältestress-Experimente wurden in Anzuchtschränken der Firma Percival unter äquivalenten Lichtbedingungen und einer Temperatur von konstant 8 °C durchgeführt.

2.2.2 Genotypisierung

Die verwendeten T-DNA-Insertionslinien wurden mittels spezifischer Primer in PCR-Analysen auf die Anwesenheit der T-DNA untersucht. Dabei wurden jeweils eine PCR mit einem genspezifischen Primerpaar, sowie eine PCR mit einem genspezifischen Primer und einem Gegenprimer, der innerhalb der T-DNA liegt, durchgeführt. Da die Länge der einer T-

DNA mindesten 5 kb beträgt, ist es in einer Standard-PCR nicht möglich mit genspezifischen Primern ein Produkt zu detektieren, wenn eine T-DNA- Insertion vorliegt. Ist keine Insertion vorhanden, wird dagegen ausschließlich mit dem genspezifischen Primerpaar ein Produkt generiert. Pflanzen, deren Homozygotie für eine T-DNA-Insertions durch diese PCR-Analysen belegt werden konnten, wurden in anschließenden Western-Analysen auf die Abwesenheit der zugehörigen Proteine überprüft.

2.2.3 Stroma Extraktion

Die Gewinnung intakter Chloroplasten erfolgte mit einigen Modifikationen nach dem Protokoll von Ljerka Kunst (1998). Es wurden 14 Tage alte Arabidopsis-Pflanzen verwendet, deren Anzucht in Petrischalen auf Nylon-Netzen mit einer Maschengröße von ca. 0,2 mm (Nybolt PA-200/54; Franz Eckert GmbH) auf einem 1:1 Gemisch aus Erde und Vermiculite erfolgte. Ganze Pflanzen wurden mit einer Rasierklinge, möglichst ohne Kontamination durch Erde, geerntet und in einem handelsüblichen Standmixer mit Homogenisierungspuffer (ca. 50 ml pro Petrischale) viermal für je 4 s zerkleinert und sofort für 6 min bei 500 x g zentrifugiert (Sorvall® RC 6). Die erhaltenen Pellets, welche neben intakten Chloroplasten Nuklei sowie Zellwand- und Membranbestandteile enthalten, wurden in 2 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen und auf 40% / 80% Percollgradienten geladen. Die Trennung der intakten von zerbrochenen Chloroplasten und anderen Zellbestandteilen erfolgte durch Zentrifugation für 30 min bei 6500 x g mit den geringsten Einstellungen für Beschleunigung und Bremse. Gebrochene Chloroplasten befanden sich in der oberen der zwei gebildeten Banden, da sie aufgrund ihrer geringeren Masse weniger weit in den Gradienten eindringen und wurden verworfen. Intakte Chloroplasten wurden aus der unteren Bande abgenommen, mit 25 ml Resuspendierungspuffer gewaschen und bei 500 x g repelletiert.

Der Aufschluss der Chloroplasten erfolgte daraufhin durch ihre Resuspension in Extraktions-Puffer (ca. 150 µl bei 6 Petrischalen Ausgangsmaterial) und anschließende Applikation mechanischen Stresses in Form von 30 - 50 Pipettierschritten mit einer Kanüle (0,4 mm x 20 mm).

Die Trennung von Stroma und Membranen erfolgte durch 15 minütige Zentrifugation bei 21000 x g.

<u>Homogenisierungspuffer</u>	<u>Resuspendierungspuffer</u>	<u>Extraktions-Puffer</u>
0,45 M Sorbitol	0,3 M Sorbitol	200 mM KOAc
20 mM Tricine-KOH, pH 8,4	20 mM Tricine-KOH, pH 8,4	30 mM HEPES, pH 8,0
10 mM EDTA	2,5 mM EDTA	10 mM MgOAc

10 mM NaHCO ₃	5 mM MgCl ₂	2 mM DTT
0,1% BSA		Proteinase Inhibitor Cocktail (ROCHE)

2.2.4 Ko-Immunpräzipitation (CoIP)

Für jede CoIP wurde Stroma mit einer Proteinmenge zwischen 200 µg und 400 µg im Verhältnis 1:1 mit CoIP-Puffer verdünnt, mit je 8 µl der affinitätsaufgereinigten Antikörper versetzt und für eine Stunde in einem Überkopfschüttler bei 12 rpm und 4 °C inkubiert.

Für Kontrollexperimente wurde entweder Stroma der Nullmutanten verwendet oder es wurden anstelle der spezifischen Antikörper je 8 µl der zugehörigen Präimmunseren oder 5 µl eines monoklonalen, gegen das *Haemophilus influenzae* Epitop gerichteten anti-HA-Antikörpers (produziert in Maus; SIGMA) eingesetzt. Nach Zugabe von 50 µl an Protein-G gekoppelten Magnetkügelchen (Dynabeads® ProteinG; Invitrogen) erfolgte eine 45 minütige Inkubation bei 4 °C und 12 rpm in einem Überkopfschüttler.

Anschließend wurden die Magnetkügelchen mit Hilfe eines Magneten (Magnarack™, Invitrogen) am Boden des Reaktionsgefäßes gesammelt und nach Abnehmen des Überstands 3-mal mit je 500 µl CoIP Puffer gewaschen.

CoIP-Puffer

0,15 M NaCl
20 mM Tris-HCl (pH 7,5)
2 mM MgCl₂
1 mM EDTA
0,5 Vol.-% Nonidet P-40

2.2.5 Extraktion genomischer DNA

Genomische DNA wurde mit Hilfe einer Schnellextraktionsmethode nach Edwards et al. (1991) gewonnen. Blattmaterial mit einem Durchmesser von ca. 5 mm wurde in flüssigem Stickstoff mit einem Pistill direkt in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß homogenisiert und mit 750 µl Extraktionspuffer gemischt. Nach 5 - 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte ein dreiminütiger Zentrifugationsschritt bei 20000 x g. 300µl des resultierenden Überstands wurden mit einem Volumen Isopropanol versetzt und 10 min bei 20000 x g zentrifugiert. DNA Pellets wurden luftgetrocknet und anschließend in 1 x TE Puffer resuspendiert.

Extraktionspuffer

200 mM Tris-HCl pH 7,5

250 mM NaCl

25 mM EDTA

0,5% SDS

TE Puffer

10mM Tris-HCl pH 8,0

1 mM EDTA pH 8,0

2.2.6 RNA Extraktion

Die Extraktion von Gesamt-RNA erfolgte mittels TRIzol® Reagenz (Invitrogen) nach Herstellerangaben.

2.2.7 Überprüfung der RNA Qualität und Quantität

Die Konzentration der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe eines Nanodrop Spektrophotometers (ND-1000, PEQLAB) bestimmt. Eventuelle Degradation der RNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Hierzu wurden gleiche Mengen der RNA-Proben mit einem Formamid-haltigen Puffer (2x RNA Loading Dye, Fermentas) versetzt, 10 min bei 75 °C denaturiert und anschließend in einem nicht-denaturierenden Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anhand der zytosolischen ribosomalen 28S- und 18S RNA konnte die Qualität der RNAs eingeschätzt werden. Liegen beide rRNAs als scharfe Banden im Verhältnis 2:1 vor, ist die RNA intakt. Eine im Vergleich zur 18S-rRNA weniger intensive 28S rRNA-Bande weist auf partielle Degradation der RNA hin. Solche RNA-Proben wurden nicht für weitere Analysen verwendet.

2.2.8 cDNA Synthese

Für das Umschreiben der RNA in cDNA wurde Omniscript® Reverse Transkriptase (Qiagen) verwendet.

Zunächst wurden eventuelle Verunreinigungen der RNA-Proben mit genomischer DNA enzymatisch mit Hilfe der DNase I (Roche) entfernt. Bis zu 8 µg RNA wurden mit H₂O auf ein Volumen von 176 µl gebracht, mit 20 µl DNaseI Puffer und 4 µl (40 U) DNase I versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die RNA wurde zuerst mit einem Volumen eines 1:1 Phenol/Chloroform Gemisches, dann mit einem Volumen Chloroform extrahiert (Sambrook und Russell, 2001) und anschließend durch Zugabe von 3 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) bei 21000 x g für 15 min gefällt und mit 75%igem Ethanol bei 21000 x g für 5 min gewaschen. Die reverse Transkription erfolgte innerhalb einer Stunde bei 37 °C in Anwesenheit von 1 mM dNTPs, 1 µM Primer, 1x Reaktionspuffer

und 4 U Omniscript Reverse Transkriptase. Als Primer wurde hier ein 1:1 Gemisch von 6 Basen und 9 Basen langen Oligonukleotiden zufälliger Sequenz verwendet.

2.2.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten PCR Reaktionen wurden entweder eine *Thermus aquaticus* DNA Polymerase (Taq-Polymerase), nach Aufreinigung aus einem rekombinanten *E. coli* Stamm (Desai et al., 1995) oder die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (Fermentas) verwendet.

2.2.10 Northern Analysen

2.2.10.1 Denaturierende RNA Gelelektrophorese

Gesamt-RNA wurde, wie bei Sambrook und Russell (2001) beschrieben, in denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Für ein Gel (15 cm x 17 cm) wurden 1,5 g Agarose in 113 ml H₂O bidest. aufgekocht und nach Abkühlen auf 65 °C mit 15 ml MOPS Puffer(pH 7,0) und 26 ml Formaldehyd (37%, SIGMA) versetzt.

Gleiche Mengen RNA wurden mit 3 Volumen Denaturierungspuffer versetzt, 15 min bei 75 °C inkubiert und in 1x MOPS Puffer für 2 - 3 h bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.10.2 Northern Transfer

Anschließend wurden die RNAs über Nacht mittels Kapillarblot (Sambrook und Russell, 2001) auf eine Nylon-Membran (Hybond-N, GE Healthcare) transferiert. Durch UV-Bestrahlung (150 mJ/cm²; GS Genelinker, Bio-Rad) und Trocknung der Membran für 10 min bei 65 °C wurden die RNAs auf der Membran fixiert.

Die gleichmäßige Ladung sowie die Intaktheit der RNAs wurden abschließend durch Methylenblau-Färbung kontrolliert.

2.2.10.3 Herstellung radioaktiver RNA-Sonden

Zunächst wurden PCRs mit reversen Primern durchgeführt, die zusätzlich zur genspezifischen Sequenz eine T7-Promotorsequenz enthalten (Anhang 1, Tab. 2). Diese PCR-Produkte konnten anschließend von der T7-Polymerase gebunden und unter Einbau radioaktiv markierter Nukleotide (hier [³²P] α-UTP) in RNA umgeschrieben werden. Hier wurde die T7-Polymerase der Firma Fermentas, den Herstellerangaben folgend, verwendet. Nicht eingebaute Radioaktivität wurde durch Gelfiltration (G-25 Gelfiltrationssäulchen, GE

Healthcare) entfernt. Die Sonden wurden sowohl in Northern- als auch in *Dot-Blot*-Analysen eingesetzt.

2.2.10.4 Hybridisierung

Die Northern-Membranen wurden für 1 h in Church-Hybridisierungspuffer bei 68 °C vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der radioaktiven Sonde und eine Inkubation bei über Nacht bei 68 °C. Die Membranen wurden anschließend für jeweils 15 min in 0,2x SSC; 0,1% SDS, 0,1x SSC; 0,1% SDS und 0,05x SSC; 0,1% SDS ebenfalls bei 68 °C gewaschen.

2.2.10.5 Detektion

Die Detektion der radioaktiv markierten Transkripte erfolgte autoradiographisch nach Belichtung eines Phosphor *screens* mit einem Phosphorimagersystem (PMI FX, Bio-Rad). Die Auswertung der detektierten Signale erfolgt mit der Quantity-One-Software (Bio-Rad).

<u>MOPS Puffer</u>	<u>Denaturierungspuffer</u>	<u>Church-Hybridisierungspuffer</u>
200 mM MOPS	1,3x MOPS Puffer,	0.5 M Natrium-Phosphat-Puffer,
80 mM Natriumacetat	pH 7,0	pH 7,0
10 mM EDTA, pH 8,0	9,25% (v/v) Formaldehyd	7% SDS
	62,5% (v/v) Formamid	1 mM EDTA, pH 8,0

Methylenblau

0.03% Methylenblau

0.3M Natriumacetat, pH 5,2

2.2.11 Herstellung spezifischer Antikörper

Um Antikörper zu erhalten, die spezifisch gegen CP31A, bzw. CP29A gerichtet sind, wurden die Proteinsequenzen aller Vertreter der Arabidopsis cpRNP-Familie mit Hilfe der *ClustalW Multiple alignment* Funktion der BioEdit Software verglichen und einzigartige Peptide für CP31A und CP29A ausgewählt.

2.2.11.1 anti-CP31A

Für den anti-CP31A Antikörper wurden 2 Peptidsequenzen an den “Pineda Antikörper-Service” zur Produktion synthetischer Peptide und anschließender Immunisierung von Kaninchen übergeben.

Da der resultierende Antikörper Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen, ähnlichen

Laufverhaltens im SDS-Gel aufwies, wurde das Serum über eine Sepharose-6B Säule, die immobilisiertes Peptid 2 enthielt, affinitäts-aufgereinigt.

CP31A Peptid 1 NH₂-CEGRAIRVNVAEERPPRRGY-CONH₂

CP31A Peptid 2 NH₂-CVNKAAPRGSRPERAPRVYE-CONH₂

2.2.11.2 anti-CP29A

CP29A besitzt einen 32 nt langen Serin- und Glyzin-reichen Sequenzbereich, der zwischen den zwei RRM-Motiven liegt und in keinem anderen der Arabidopsis cpRNPs zu finden ist. Aus diesem Bereich wurde eine Peptidsequenz ausgewählt und der Firma „Agrisera *Synthetic Peptide*“ zur Antikörperproduktion in Kaninchen übergeben.

CP29A Peptid NH₂-CEGRAIRVNVAEERPPRRGY-CONH₂

2.2.12 RIP-Chip Analysen

2.2.12.1 Herstellung eines Plastom überspannenden *Microarrays* (*tiling array*)

Eine von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ian Small (Centre of Excellence, Plant Energy Biology, Western Australia) freundlicherweise zur Verfügung gestellte Auswahl von PCR-Oligonukleotiden wurde derart ergänzt, dass die resultierenden PCR-Produkte das gesamte Chloroplastengenom von *A. thaliana* bis auf wenige Lücken (Anhang 1, Tab. 3) überlappend abdecken.

Die PCR-Produkte wurden mittels Taq-Polymerase (Desai et al., 1995) amplifiziert und über das QIAquick 96 PCR *Purification Kit* (QIAGEN) aufgereinigt.

Je 500 ng jedes PCR-Produkts wurde in eine Mikrotiterplatte mit 348 Vertiefungen übertragen, in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet und in je 5 µl 1 M Betain in 3x SSC resuspendiert. Mit Hilfe des OMNIGRID ACCENT *microArrayer* (GeneMachines) wurde jedes PCR-Produkt in 12 Wiederholungen auf silanisierte Objektträger (*Vantage Silanated Amine Slides*; CEL Associates, Inc.) gedruckt.

2.2.12.2 Herstellung eines Oligonukleotid-*Microarrays*

Um die Orte der RNA-Protein Interaktion einzuengen wurden 50 nt lange Oligonukleotide entworfen, die Sequenzen innerhalb einiger RNA-Ziele der zu untersuchenden cpRNPs abdecken (Anhang 1, Tab. 4).

Es wurden 100 pmol jedes Oligonukleotids in eine Mikrotiterplatte mit 348 Vertiefungen

übertragen und mit dieser weiter verfahren wie oben beschrieben.

2.2.12.3 RNA Extraktion

Um zunächst die RNA-Protein-Komplexe in den Überstand- und Pellet-Fractionen der Ko-Immunpräzipitation zu lösen, erfolgte eine kurze Inkubation (5 min, 23 °C) nach der Zugabe von 5 mM EDTA und 1% SDS. Die RNA wurde dann durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion (Sambrook und Russell, 2001) und anschließende einstündige Fällung mit 3 Volumen Ethanol bei -20 °C gewonnen. Die RNA-Pellets wurden mit 75%igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur für ca. 5 min luftgetrocknet und in 20 µl RNase freiem H₂O resuspendiert.

2.2.12.4 Fluoreszenzmarkierung der RNA

Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mit Hilfe des *ULSTM aRNA labeling Kits* der Firma KREATECH Diagnostics nach Herstellerprotokoll mit leichten Modifikationen. Die gesamte aus Überstand und Pellet einer IP gewonnene RNA wurde für die Markierungsreaktionen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy5 und Cy3 eingesetzt. Es wurden 17,5 µl der Pellet-RNA mit 0,5 µl Cy5 und 17 µl der Überstand-RNA mit 1 µl Cy3 gemischt und nach Zugabe von 2 µl 10x *Labeling Buffer* 20 min bei 85 °C inkubiert. Der Anteil nicht eingebauter Fluoreszenzfarbstoffe wurde anschließend mittels Zentrifugation durch Gelfiltrationssäulchen (*KREApure purification columns*, KREATECH Diagnostics) entfernt.

In einer Vakuumzentrifuge wurden die markierten RNAs auf ein Volumen von ca. 5 - 10 µl eingeeengt und mit einem Volumen Hybridisierungspuffer gemischt. Abschließend wurden jene Pellet- und Überstand-RNAs, die aus einer IP stammten, vereinigt.

2.2.12.5 Hybridisierung der Microarrays

Zunächst erfolgte die Fixierung der gedruckten DNAs auf der *Array*-Oberfläche via UV-Crosslink (250 mJ/cm²; *GS Gene Linker*; BIORAD), dann wurde die nicht bedruckte Oberfläche der *Arrays* durch einstündige Inkubation mit BSA (bovines Serumalbumin)-haltiger Blockierungslösung bei 42 °C maskiert. Nach zwei kurzen Waschschritten in bidest. H₂O und Isopropanol wurden die *Arrays* für 2 min in einer Plattenzentrifuge (Heraeus Multifuge 1S-R) bei 200 x g getrocknet.

Anschließend wurden die markierten RNAs mittig auf den bedruckten Bereich des *Arrays* pipettiert und ein Deckglas wurde aufgesetzt. Die Hybridisierung erfolgte in *Corning® MicroArray Hybridization Chambers* über Nacht in einem auf 42 °C temperierten Wasserbad.

Die *Arrays* wurden dann für jeweils 10 min in 2x SSC, 0.2% SDS; 1x SSC, 0.2x SSC und 0.05x SSC auf einem Schüttler bei 180 rpm gewaschen, für 2 min in der Plattenzentrifuge bei 200 x g getrocknet und schließlich am *ScanArray Gx Plus microArray scanner* (Perkin Elmer) eingelesen.

<u>Hybridisierungspuffer</u>	<u>Blockierungslösung</u>
25 µl Formamid	1% BSA
25 µl 20x SSC	0.1% SDS
1 µl 10% SDS	5 x SSC

2.2.12.6 Auswertung der *Microarrays*

Die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte mit Hilfe der GenePix 7.0 Software (Molecular Devices). Es wurden nur solche Daten in die Analyse einbezogen, in denen mindestens 6 von jeweils 12 technischen Replikaten des eigentlichen Experiment und des Kontroll-Experiments Fluoreszenzintensitäten lieferten, die sich über die lokale Hintergrund-Fluoreszenz erheben. Der Ausschluss sehr niedriger Fluoreszenzintensitäten erfolgte automatisch durch einen Algorithmus der GenePix 7.0 Software. Für jeden einzelnen *spot* erfolgte zunächst die Berechnung der Verhältnisse aus Pellet-Signal (Cy5) und Überstand-Signal (Cy3). Aus den für jedes PCR-Produkt zur Verfügung stehenden 6 - 12 Replikaten dieser Cy5/Cy3-Verhältnisse wurde anschließend der Median gebildet.

Für die graphische Darstellung der Daten, wurden die Präzipitat/Überstand-Verhältnisse von Experiment und Kontrolle, bzw. die mehrerer biologischer Replikate auf die Überstand-Fluoreszenzen eines willkürlich ausgewählten Experiments (Cy3) normalisiert.

2.2.13 Dot-Blot Analysen

Alternativ zu den RIP-Chip-Analysen können Protein-RNA-Interaktionen auch mittels CoIP und anschließender *Dot-Blot* Hybridisierung nachgewiesen werden. Diese Methode wurde hier zur Bestätigung der RIP-Chip Ergebnisse eingesetzt.

Die RNAs aus Pellet- und Überstandfraktionen einer CoIP wurden mit je 300 µl eines denaturierenden Puffers (66% deionisiertes Formamid; 7,7% Formaldehyd; 1.3x MOPS Puffer, pH 7,0) versetzt, 15 min bei 75 °C inkubiert und anschließend mit Hilfe einer Mikrofiltrationsapparatur (*Bio-Dot® SF Microfiltration Apparatus*, Bio-Rad) auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond N; GE Healthcare) übertragen. Nach der Applikation der RNA wurden alle *Dots* mit 10x SSC gewaschen. Die RNA wurde schließlich mittels UV-Strahlung (150 mJ/cm²) auf der Membran fixiert und mit Methyleneblau angefärbt.

Die Herstellung radioaktiver Sonden, sowie deren Hybridisierung und Detektion erfolgte wie weiter oben für Northern-Analysen beschrieben. Die Sequenzen der PCR-Oligonukleotide, die für die Herstellung der Sonden verwendet wurden, sind im Anhang aufgelistet (Anhang 1, Tab. 2)

2.2.14 Western Analysen

Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff in einer Schwingmühle (2 x 30 s, 30 Hz; MM 400; RETSCH®) zerkleinert und in einem Protein-Isolationspuffer homogenisiert. Wenn nötig wurden lösliche und Membranbestandteile durch Zentrifugation (10 min, 21000 x g) getrennt. Das membranhaltige Pellet wurde dreimal mit Protein-Isolationspuffer gewaschen und anschließend in dem gleichen Puffer resuspendiert. Die Bestimmung der Proteinmengen erfolgte mit dem Bio-Rad Protein *Assay* nach Herstellerangaben.

Die Proteine (lösliches, Membran- oder Gesamtprotein) wurden daraufhin unter Verwendung des Mini-Protean-III™ Systems (Bio-Rad) in SDS-Polyacrylamid-Gelen mit 4%igen Sammel- und 13%igen Trenngelen entsprechend ihrer molekularen Masse elektrophoretisch (50 - 100 V, 2 - 3 h) getrennt. Danach wurden die Proteine mit Hilfe einer *Mini Trans-Blot Cell* (Bio-Rad) über Nacht bei 35 V auf Nitrozellulosemembranen (Hybond-C Extra, GE Healthcare) transferiert. Die geladenen Mengen sowie die Qualität der Proteine wurden durch Anfärben der Membranen mit Ponceau S kontrolliert. Primäre Antikörper wurden in 2% Milch (*Skim milk powder*, SIGMA) in TBST im Verhältnis 1:3000 für anti-CP29A- und anti-CP31A-Antikörper und nach Herstellerangaben für kommerziell erhältliche Antikörper verdünnt und für 1 h mit den Membranen inkubiert. Der sekundäre anti-Kaninchen-HRP Antikörper (*monoclonal anti-rabbit IgG (whole molecule) peroxidase*; SIGMA) und wurde in einer Verdünnung von 1:10000 für 1 h mit den Membranen inkubiert.

Die Detektion basierte auf Chemolumineszenz und erfolgte mit dem *SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific).

<u>Protein-Isolationspuffer</u>	<u>Trenngel (13%)</u>	<u>Sammelgel (4%)</u>
10% Saccharose	3,4 ml H ₂ O	6,8 ml H ₂ O
100 mM Tris-HCl, pH 7,2	7,5 ml 1M Tris-HCl, pH 8,8	1,3 ml 1M Tris-HCl, pH 6,8
5 mM EDTA	8,6 ml 30% A/BA	1,66 ml 30% A/BA
	200 µl 10% APS	100 µl 10% APS
	10 µl TEMED	10 µl TEMED

2.2.15 Quantitative *real time* (qRT-) PCR

Die qRT-PCRs wurden unter Verwendung des *LightCycler* 480 Roche *Real Time* PCR Systems durchgeführt, wie bei De Longevialle, 2008 beschrieben.

Die erhaltenen Daten wurden auf den Median aller untersuchten Gene (Gesamtheit der Chloroplastengene und die zytosolische 18S rRNA) normalisiert, indem dieser 1 gesetzt und alle anderen Werte daran angepasst wurden. Eine Normalisierung auf die 18S-rRNA lieferte annähernd identische Ergebnisse. Eine Liste der verwendeten PCR-Oligonukleotide befindet sich bei De Longevialle (2008).

2.2.16 *Run-on* Transkription

Die Analyse der Transkriptionsraten wurde unter freundlicher Betreuung durch Dr. Maria Yamburenko unter Verwendung von Arabidopsis-Chloroplasten, die wie unter 2.2.3 beschrieben präpariert wurden, durchgeführt. Die *Run-on* Transkription erfolgte durch die Zugabe von [α - 32 P]UTP, sowie nicht markierter NTPs zu 5×10^7 Chloroplasten für 15 min. Die in diesem Zeitraum synthetisierten, 32 P-markierten Transkripte wurden durch Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanol-fällung isoliert und mit DNA-Fragmenten (PCR-Produkten), die zuvor auf eine Nylon-Membran (Hybond N+; GE Healthcare) fixiert wurden, über Nacht bei 58 °C hybridisiert. Die hier verwendeten PCR-Produkte repräsentieren verschiedene Chloroplasten-Gene. Auf einer Membran befanden sich jeweils zwei technische Replikate jedes PCR-Produkts.

Eine ausführliche Beschreibung der Methode findet sich bei Zubo und Kusnetsov (2008). Die Detektion und Auswertung der Signale erfolgte wie unter 2.2.10.5 beschrieben.

2.2.17 Edierungsanalysen

Der Edierungsstatus der C→U Edierungsstellen Arabidopsis-Chloroplasten wurde durch Sequenzierung cDNA-basierter PCR-Produkte von Col-0 und einer *cp29a*-Mutante in selbst hergestellten Polyacrylamid-Harnstoffgelen mit Hilfe des ABI PRISMTM 377 *DNA Sequencer* oder durch die Firma SMB (*Services in Molecular Biology* GmbH) untersucht. Die hierbei verwendeten PCR-Oligonukleotide sind im Anhang aufgelistet (Anhang 1, Tab. 5).

Im Falle der selbst durchgeführten Sequenzierungen wurden Edierungsstellen umspannende PCR-Produkte mit dem *NucleoSpin® Extract II Kit* (Macherey & Nagel) aufgereinigt. Pro Sequenzierungsreaktion wurden zwischen 100 ng und 1 µg PCR-Produkt, 0,5 pmol/µl sowie 2 µl des DYEnamic ET-Terminator Mix (Amersham Bioscience) eingesetzt und nach folgendem Temperaturprogramm inkubiert: 25 x (2 min, 95 °C; 10 s, 95 °C; 5 s, 50 °C; 4 min, 60 °C).

Die DNA wurde anschließend mit 2,5 Volumen Ethanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Die präzipitierten DNAs wurden in je 3 µl *Formamide Loading Dye* (Amersham Bioscience) resuspendiert und je 1 µl in 6,3%igen Sequenziergelen elektrophoretisch für 10 h getrennt.

Sequenzgel

18 g Harnstoff

22,8 ml H₂O

5,33 ml AccuGel 29:1 (40% A/BA; National Diagnostics)

6 ml 10 x TBE

200 µl 10% APS

20 µl TEMED

3 Ergebnisse

3.1 Das Fehlen von CP31A und CP29A führt nicht zu makroskopischen Defekten

Phänotypische und genetische Analysen von *cp31a*, sowie *cp31b* Null-Mutanten erfolgten in dieser Arbeit anhand der bereits in Tillich et al. (2009) beschriebenen T-DNA-Insertionslinien *cp31a-1* (SALK_109613), *cp31a-3* (SALK_109613) und *cp31b-4* (WiscDsLox383H9).

Für CP29A wurden Null-Mutanten mittels PCR-Analyse (verwendete Primer sind im Anhang aufgelistet: Anhang 1, Tab. 6) aus den F1-Generationen zweier T-DNA-Insertionslinien (SALK_003066 und 001G06, im Folgenden als *cp29a-1* und *cp29a-6* bezeichnet) isoliert (Abb. 3A). Homozygote Individuen zeigten die vollständige Absenz von CP29A auf Proteinebene (Abb. 3B).

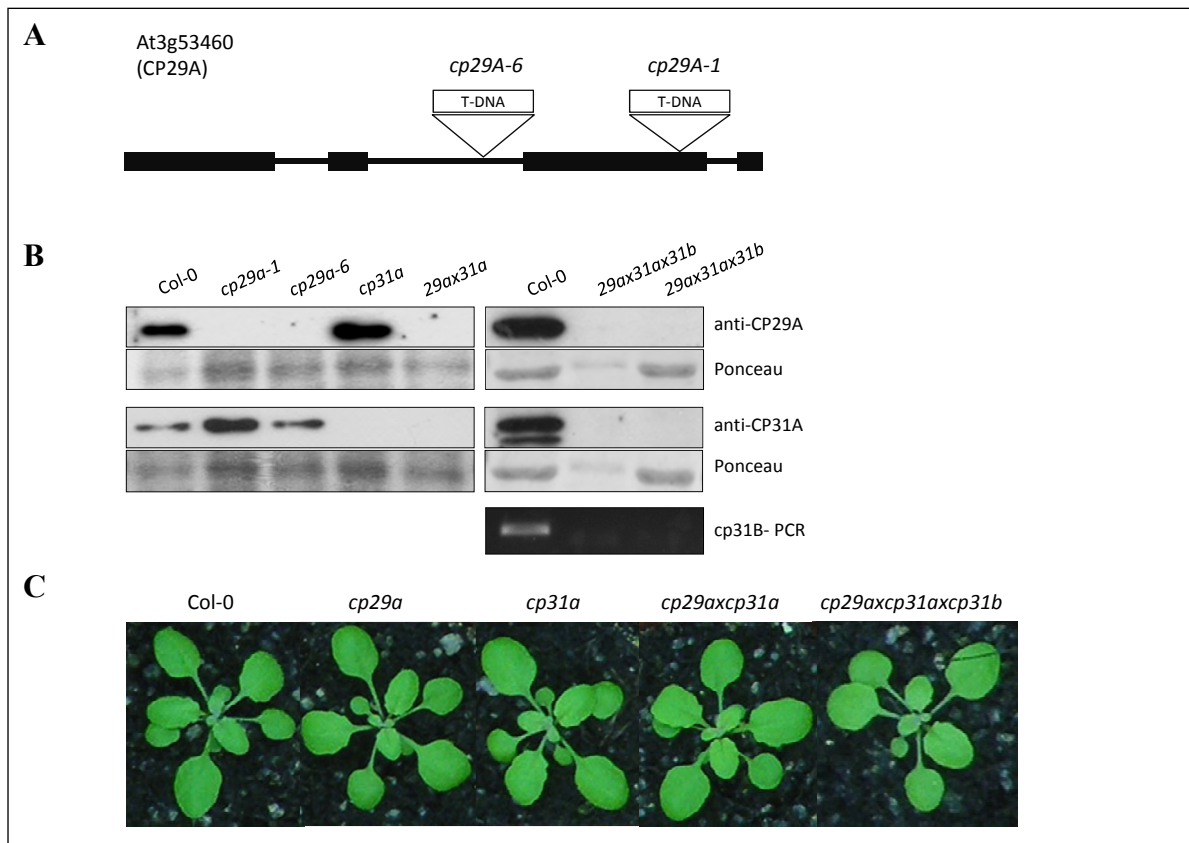


Abbildung 3 Isolierung von *cp29a*- und *cp31a*-Null-Mutanten **(A)** Genkarte von *CP29A*. Die Lage der T-DNA in den für diese Arbeit verwendeten T-DNA-Insertionslinien *cp29a-1* (SALK_003066) und *cp29a-6* (001G06) ist jeweils mit einem Dreieck markiert. Schwarze Balken repräsentieren die vier Exons, schwarze Linien die drei Introns der *CP29A*-mRNA. **(B)** Western-Analyse der Einzel- und Doppel- sowie Tripelmutanten mit anti-CP29A- und anti-CP31A-Antikörpern und PCR-Analyse der *CP31B*-mRNA in Tripelmutanten. **(C)** Phänotypen von drei Wochen alten unter Standard-Wachstumsbedingungen angezogenen Wildtyp-Pflanzen, sowie der unter (B) analysierten Mutanten.

Da das Fehlen von CP29A und CP31A in Einzelmутanten keine makroskopischen phänotypischen Abweichungen von Columbia-0 (Col-0)-Pflanzen verursachte (Abb. 3C), wurde eine genetische Kreuzung von *cp31a-3*-Mutanten (Tillich et al., 2009) und *cp29a-1*-Individuen durchgeführt, um potentielle funktionelle Redundanzen dieser Proteine aufzudecken.

Nach Selbstung der heterozygoten F1-Generation wurden aus der F2-, sowie der F3-Generation durch PCR-Analyse *cp29a-1* x *cp31a-3*-Doppelmutanten isoliert (für Primersequenzen s. Anhang 1, Tab. 6). Da eine Doppelmutante, in der neben CP31A auch das nah verwandte cpRNP CP31B ausgeschaltet ist, für diese Kreuzung zur Verfügung stand (*cp31a-3* x *cp31b-4*; Tillich et al., 2009), wurden außerdem *cp29a-1* x *cp31a-3* x *cp31b-4*-Triplemutanten erstellt. Die Abwesenheit von CP29A und CP31A in diesen Mutanten konnte mittels Western-Analyse belegt werden (Abb. 3B). Da kein zuverlässiger Antikörper gegen CP31B zur Verfügung stand, wurde die Absenz von nicht durch T-DNA-Insertion unterbrochenen *CP31B*-Allelen via PCR nachgewiesen (Abb. 3B, Primersequenzen im Anhang 1, Tab. 6). Auch die Abwesenheit zweier, bzw. dreier cpRNPs resultierte nicht in makroskopischen Defekten (Abb. 3C).

3.2 Identifizierung der RNA-Interaktionspartner von CP29A und CP31A

3.2.1 Ko-Immunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern

Nachdem die Fähigkeit von cpRNPs mit RNAs zu interagieren hinreichend durch diverse *in vitro* (Li und Sugiura, 1991; Ye und Sugiura, 1992; Lisitsky et al., 1994; Lisitsky et al., 1995) und *in vivo* (Nakamura et al., 1999) Experimente belegt worden ist, soll in dieser Arbeit die Gesamtheit aller plastidären *in vivo* RNA-Interaktionspartner von CP29A und CP31A identifiziert werden. Zunächst wurden Immunpräzipitationen (IP) unter Verwendung polyklonaler Peptidantikörper, die spezifisch gegen CP29A, bzw. gegen CP31A gerichtet sind, durchgeführt. Diese Antikörper gegen ausgewählte Peptide wurden im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit der Firma Pineda erstellt. Abbildung 4 zeigt die erfolgreiche Immunpräzipitation beider Proteine. CP29A wurde hierbei quantitativ präzipitiert, d.h. das Protein konnte im IP-Überstand nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 4, links). CP31A konnte ebenfalls erfolgreich präzipitiert werden, allerdings verblieb hier ein Anteil von mehr als 50% des Proteins im IP-Überstand (Abb. 4, rechts). Es wurden außerdem Kontroll-IPs mit *cp29a*- und *cp31a*-Null-Mutanten durchgeführt, um zu bestätigen, dass die in den Immunpräzipitaten detektierten Signale durch das jeweilige cpRNP und nicht durch

eventuelle Kreuzhybridisierungen der verwendeten Antikörper verursacht wurden. In Western-Analysen konnte weder im Überstand noch im Präzipitat dieser Kontroll-IPs Proteinsignale detektiert werden (Abb. 4).

Die IPs wurden bei 4 °C möglichst zügig (Gesamtdauer: zwei Stunden) in einem isotonischen Puffer durchgeführt, um das Persistieren *in vivo* bestehender RNA-Protein-Interaktionen zu ermöglichen. Tatsächlich konnte in den Immunpräzipitaten RNA nachgewiesen und analysiert werden.

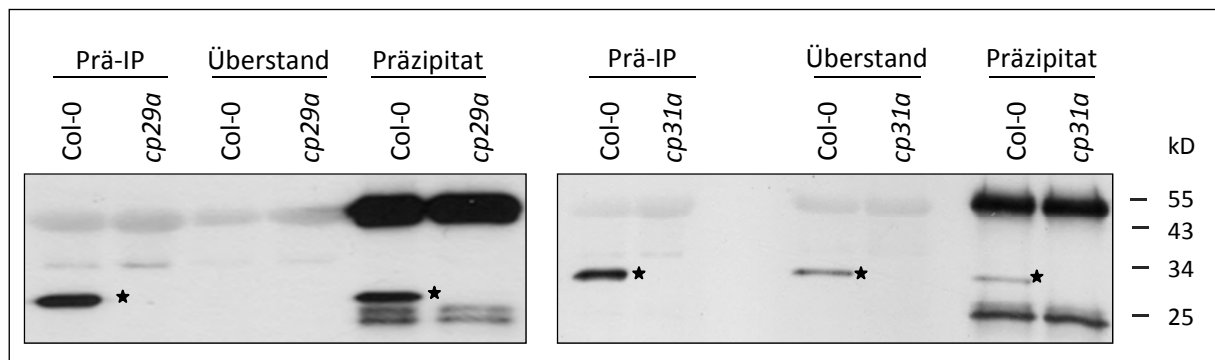


Abbildung 4 Nachweis der Immunpräzipitationen von CP29A und CP31A mittels Western-Blot. Es wurden Proteinextrakte aus Stroma vor Durchführung der IP (Prä-IP), sowie aus dem IP-Überstand und dem Präzipitat analysiert. Als Kontrolle für die Spezifität der beobachteten Signale dienen *cp29a-1* und *cp31a-3* Mutanten. Sternchen markieren CP29A (links) und CP31A (rechts). Die Signale bei ca. 55 kD und bei ca. 25 kD werden durch die schweren und leichten Ketten der für die IP verwendeten Antikörper verursacht.

3.2.2 CP29A und CP31A interagieren mit multiplen RNAs

Aus den Überständen und Präzipitaten der IPs, sowie der Kontroll-IPs, die unter Verwendung von Null-Mutanten oder den jeweils zugehörigen Präimmunseren durchgeführt wurden, wurde RNA extrahiert und mit Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher Anregungswellenlängen (Cy3 und Cy5) chemisch markiert. Diese RNA-Fractionen wurden auf *tiling arrays* hybridisiert, die das gesamte Plastiden-Genom von *A. thaliana* in Form von überlappenden, je ca. 500 nt langen PCR-Produkte, repräsentieren, und im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurden (s. Methoden: 2.2.12). Mittels Fluoreszenzanalyse wurden die spezifisch mit CP29A und CP31A präzipitierten RNAs anschließend identifiziert. Nicht-gebundene RNAs aus den Überstandsfractionen wurden mit Cy3 markiert und fluoreszierten grün, präzipitierte RNAs fluoreszierten aufgrund ihrer Kopplung an Cy5 rot. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der GenePix 7.0 Software (Molecular Devices). Für jede IP wurden aus den Intensitäten der Fluoreszenzen der einzelnen Punkte Verhältnisse aus Präzipitat zu Überstand (roter zu grüner Fluoreszenz) ermittelt. Die Präzipitat/Überstand-Verhältnisse aller RNAs der IP und der dazugehörigen Kontroll-IP wurden anschließend in

einem Diagramm gegen die Position des zugehörigen DNA-Bereichs auf dem Chloroplastengenom von *Arabidopsis* abgetragen (Abb. 5A). Es wird deutlich, dass ein Großteil der chloroplastidären RNAs, insbesondere mRNAs, sowohl mit CP31A als auch mit CP29A kopräzipitiert, da sich die Anreicherungswerte deutlich über die der Kontrollexperimente erheben (Abb. 5A). Bei diesen Analysen wurden allerdings in allen Einzelexperimenten für CP31A insgesamt deutlich höhere Anreicherungswerte als für CP29A ermittelt. Dies spiegelt sich auch in den in Abb. 5A gezeigten Mittelwerten der RNA-Anreicherung wieder. Obwohl es sich bei der RIP-Chip-Technik um eine nicht streng quantitative Methode handelt, weist diese Beobachtung auf eine Interaktion von CP31A mit einem größeren Anteil des plastidären mRNAs-Pools im Vergleich zu CP29A hin.

Die RNA-Interaktionspartner der zwei untersuchten cpRNPs überschneiden sich allerdings mehrheitlich, auch in der relativen Stärke ihrer Anreicherung: Zu den Hauptpeaks gehören in beiden Experimenten *psbB* (kodiert CP47, eine Komponente des Reaktionszentrums von Photosystem II), *ndhB* (kodiert eine Untereinheit des membranintegralen Teils des NDH-Komplexes), *psaA/B* (kodieren die heterodimeren Kernkomponenten des Photosystem I) und *psbD* (kodiert D2, welches zusammen mit D1 das heterodimere Reaktionszentrum des Photosystem II bildet) (Abb. 5A). Wenige mRNAs scheinen spezifisch von einem der beiden cpRNPs gebunden zu sein: Der CP29A-RIP-Chip weist auf eine Interaktion mit *rbcL* (kodiert für die große Untereinheit der heteromultimeren Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Dehydrogenase (RuBisCO)) hin, CP31A ist mit der 3'-UTR der *ndhF*-mRNA assoziiert (Abb. 5A, unten). rRNAs und tRNAs sind nicht oder kaum angereichert. Da für das Tabak-cpRNP cp31 allerdings eine Interaktion mit intronhaltigen tRNAs beobachtet werden konnte (Nakamura, 1999), wurden diese auch hier näher betrachtet. Eine *Ranking*-Analyse der Anreicherungen (Verhältnisse aus den Präzipitat/Überstand-Werten von IP und Kontroll-IP) aller tRNAs zeigte eine leichte Präferenz von CP31A für tRNAs, die ein Intron enthalten, insbesondere *trnL* (UAA; tRNA Leucin), *trnA* (UGC; tRNA Adenin) und *trnI* (GAU; tRNA Isoleucin). Eine solche Abstufung konnte dagegen für CP29A nicht beobachtet werden (Anhang 1; Tab. 7).

Um die in den RIP-Chip-Analysen gefundenen RNA-Ziele mit einer alternativen Detektionsmethode zu bestätigen, wurden *Dot-Blot*-Analysen durchgeführt, welche auf der Hybridisierung radioaktiv markierter RNA-Sonden mit der präzipitierten und der nicht präzipitierten RNA beruhen. Als Kontrollen dienten hier IPs, die mit einem anti-HA (*Haemophilus influenzae* Hemagglutinin Epitop)-Antikörper durchgeführt wurden. Für eine *Dot-Blot*-Hybridisierung wurden jeweils 1/6 der aus Überstand und IP gewonnenen RNA

eingesetzt. Untersucht wurden in den RIP-Chip Analysen stark angereicherte mRNAs: *atpH* (kodiert für die Untereinheit C des membranständigen F₀-Bereichs der ATP-Synthase), *psbD*,

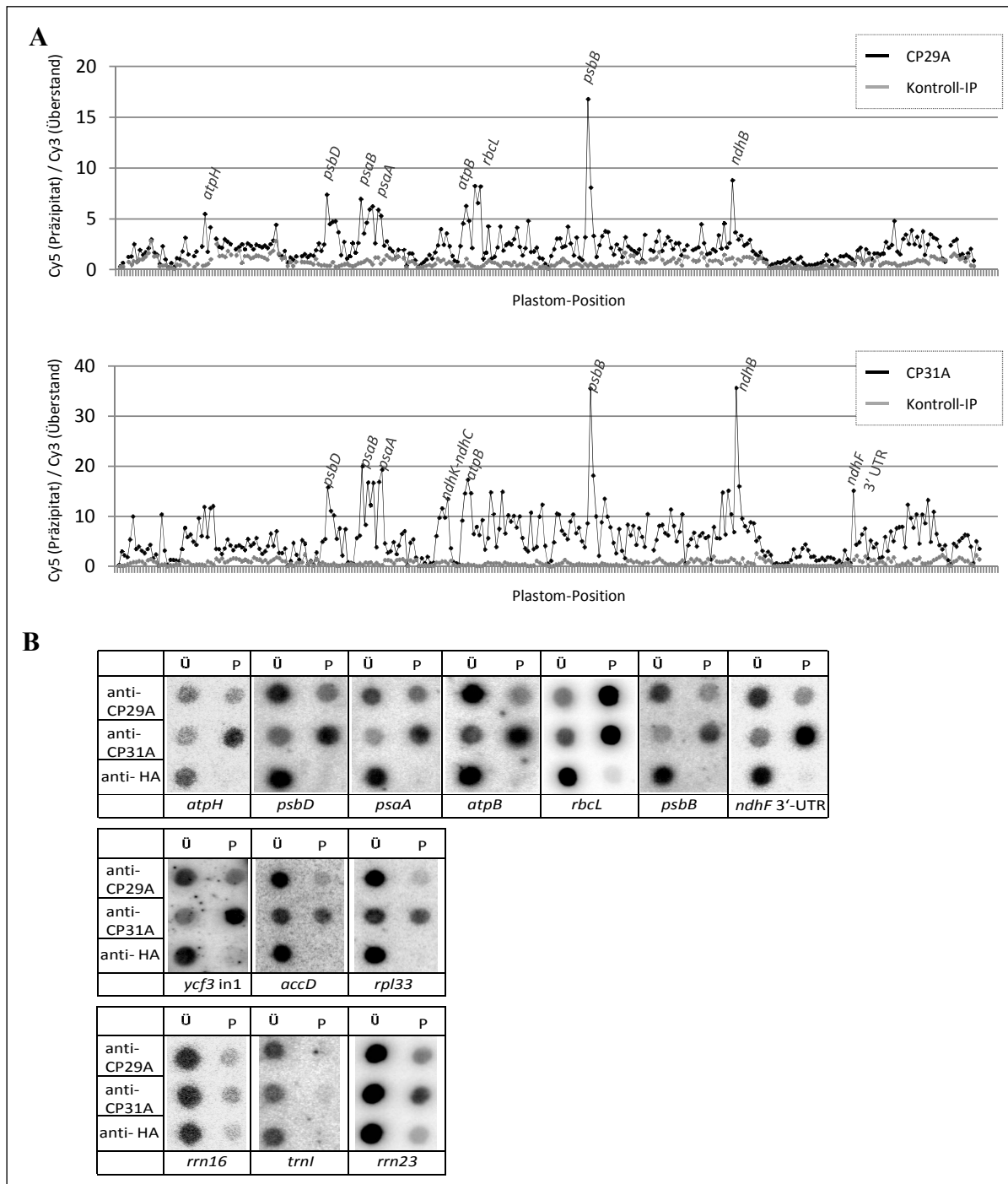


Abbildung 5 Assoziation von CP29A und CP31A mit RNA. **(A)** RIP-Chip-Analysen zur Aufklärung der RNA-Interaktionen von CP29A (oben) und CP31A (unten). Die Verhältnisse der Fluoreszenz-Intensitäten von präzipitierten zu Überstand-RNAs sind, nach ihrer Position im Chloroplasten-Genom geordnet, dargestellt. **(B)** Dot-Blot-Analysen zur Bestätigung der in RIP-Chip-Experimenten ermittelten RNA-Bindungen. Es wurden stark (oben), durchschnittlich (Mitte) oder nicht (unten) im RIP-Chip angereicherte RNAs analysiert. Es wurden jeweils die gesamten aus Überständen (Ü) und Präzipitaten (P) von CP29A-, CP31A- und HA-spezifischen IPs extrahierten RNAs auf Nylon-Membranen fixiert und mit ³²P-markierten RNA-Sonden hybridisiert.

psaA, *atpB* (kodiert für β -Untereinheit des F₁-Komplexes der ATP-Synthase), *rbcL*, *psbB* und *ndhF*, außerdem mRNAs mit durchschnittlichen Anreicherungsquotienten: *ycf3* (kodiert für einen Assemblierungsfaktor für Photosystem I), *rpl33* (kodiert für eine Komponente der großen ribosomalen Untereinheit) und *accD* (kodiert für die β -Untereinheit der Acetyl-CoA Carboxylase), sowie nicht angereicherte RNAs: *rrn16*, *trnI* und *rrn23* (Abb. 5B).

Konsistent mit den Ergebnissen der RIP-Chip Analysen waren alle mittels *Dot-Blot* analysierten RNAs in CP31A-IPs deutlich stärker angereichert als in CP29A-IPs. Einzige Ausnahme stellt die *rbcL*-mRNA dar, die etwas stärker nach Immunpräzipitation von CP29A angereichert war (Abb. 5B). Die Ergebnisse der *Dot-Blot*-Hybridisierung bestätigen die RIP-Chip Analysen im Wesentlichen. Da jeweils gleiche Anteile der Überstand- und der IP-RNA für die *Dot-Blot*-Analysen eingesetzt wurden, sind die Ergebnisse im Gegensatz zu den RIP-Chip-Analysen, die lediglich den Vergleich relativer Anreicherungen erlauben, quantitativ. Ein stärkeres Signal im Präzipitat gegenüber dem zugehörigen Überstand, bedeutet also eine Präzipitation von mehr als 50% der untersuchten RNA. Das trifft in CP31A-IPs auf *atpH*, *psbD*, *psaA*, *atpB*, *rbcL*, *psbB*, *ndhF* und *ycf3*, in CP29A-IPs ausschließlich auf *rbcL* zu (Abb. 5B).

3.2.3 CP29A und CP31A interagieren mit multiplen Bereichen eines Transkripts

Um die Orte der RNA-Interaktionen von CP31A und CP29A zu spezifizieren, wurden *Microarray*-Hybridisierungen mit Oligonukleotiden durchgeführt, welche Regionen dreier ausgewählter Transkripte repräsentieren. Für diese Analyse wurde die intronhaltige *ndhB*-mRNA, *ndhF*, welches mit CP31A, nicht jedoch mit CP29A interagiert, sowie das tricistronische *psaA-psaB-rps14*-Transkript, in dem die Gene jeweils durch kurze intergenische Bereiche getrennt sind, gewählt.

Das gesamte *psaA-psaB*-Transkript ist gegenüber den Kontrollexperimenten stark angereichert. Die nicht kodierende 5'-Region (5'-UTR) der *psaA*-mRNA, sowie die 3'-UTR der *psaB*-mRNA sind allerdings deutlich weniger mit CP29A und CP31A assoziiert. Außerdem ist eine Tendenz zur stärkeren Assoziation mit 5'- und 3'-Bereichen der beiden untersuchten offenen Leseraster *psaA* und *psaB* besonders für CP31A erkennbar (Abb. 6).

ndhB zeigt in CP29A- und CP31A-IPs eine präferentielle Anreicherung der Exon-Regionen (Abb. 6). Da Intronsequenzen ausgeprägte Sekundärstrukturen besitzen, ist die Diskriminierung von Intron- gegenüber Exon-haltigen Sequenzabschnitten, ein Hinweis auf die bevorzugte Assoziation von cpRNPs mit einzelsträngiger RNA. Auf eine solche Diskriminierung weist auch die bevorzugte Interaktion von cpRNPs mit mRNAs im

Vergleich zu den generell höher strukturierten tRNA und rRNAs (Gauss und Sprinzl, 1983; Gutell, 1994; Rich und RajBhandar, 1976) hin.

Aus den eingangs durchgeführten RIP-Chip-Analysen war abzulesen, dass die *ndhF*-mRNA mit CP31A, aber nicht mit CP29A kopräzipitierte. Die Ergebnisse der Oligo-Chip-Analyse bestätigen diese Beobachtung: Es konnte keine Anreicherung des Transkripts in CP29A-spezifischen IPs festgestellt werden. CP31A-IPs zeigten dagegen distinkte Anreicherung der *ndhF*-3'-UTR, sowie eines Bereichs, der die *ndhF*-Edierungsstelle umfasst (Abb. 6). Diese Ergebnisse decken sich mit einer Reduktion der *ndhF*-Edierung in *cp31a*-Mutanten (Tillich et al., 2009) und der drastisch reduzierten Reifung des *ndhF*-3'-Endes in diesen Mutanten (Kupsch et al., 2012). Die auf Grund ihrer geringen Anreicherung in den RIP-Chip-Experimenten als Negativ-Kontrollen ausgewählten RNAs *trnF*, *trnT* und *psaJ* waren auch hier kaum mit CP29A und CP31A assoziiert (Abb. 6).

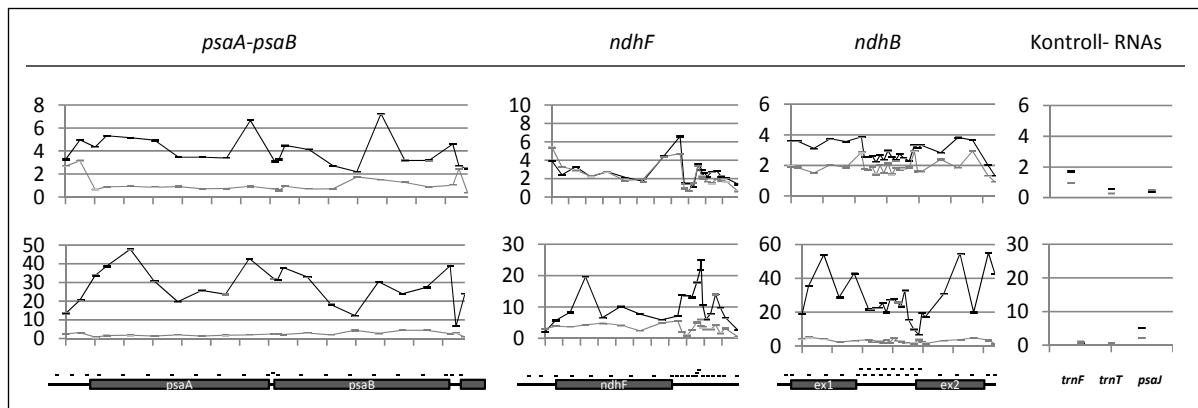


Abbildung 6 Oligonukleotid-RIP-Chip-Analysen für die Interaktion von CP29A (oben) und CP31A (unten) mit *psaA-psaB*, *ndhF* und *ndhB*. Die in den RIP-Chip-Analysen nicht angereicherten RNAs *trnF*, *trnT* und *psaJ* fungieren als Negativ-Kontrollen. Die Verhältnisse der Fluoreszenz-Intensitäten von präzipitierten RNAs zu Überstand-RNAs von jeweils drei CP29A- bzw. CP31A-spezifischen IPs, sowie von Kontroll-IPs (zwei IPs mit *cp29a*-Stroma und eine IP mit Präimmunserum im für CP29A, sowie zwei IPs mit Präimmunserum und eine HA-spezifische IP im für CP31A) sind dargestellt. Die Lage der verwendeten Oligonukleotide innerhalb der untersuchten Transkripte ist jeweils unter den Diagrammen in den zugehörigen Genkarten in Form kurzer Linien eingezeichnet. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgelistet (Anhang 1, Tab. 4).

3.3 In *cp31a*-Mutanten sind *ndh*-Transkripte, insbesondere *ndhF* reduziert

Aufgrund der generellen RNA-Bindungseigenschaften von cpRNPs und ihrer hohen Abundanz in Chloroplasten, sowie ihrer Eigenschaft in Tabak-Chloroplastenextrakten eine *in vitro* synthetisierte *psbA*-mRNA zu stabilisieren, (Nakamura, 2001), wurde vermutet, dass cpRNPs für die Stabilisierung eines plastidären mRNA-Pools verantwortlich sein könnten.

Um diesen Hinweisen *in vivo* nachzugehen, wurden in *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten die Mengen aller chloroplastidären Transkripte mittels qRT-PCR auf mögliche Reduktionen im Vergleich zum Wildtyp untersucht. In *cp29a*-Mutanten sind nur wenige minore Abweichungen der Transkriptmengen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle zu beobachten: Die Transkripte des großen ATP-Operons (*atpI/H/F/A*), *psaA/B*, sowie *ndhF* sind leicht reduziert, während *rps12*-, *rpl16*- und *rpl22*-Transkripte leicht überakkumulieren (Abb. 7A). In CP31A-defizienten Mutanten sind viele Transkripte des NDH-Komplexes reduziert (*ndhC/K/J*, *ndhB*, *ndhA/I*), darüber hinaus ist eine 3-4-fache Reduktion von *ndhF*- und *ycf1*-Transkripten zu beobachten. Die Akkumulationen vieler weiterer Transkripte variieren leicht, einige (z.B. *rps12*, *psaB*, *rbcL*, *rrn23*) sind abundanter als in der Wildtyp-Kontrolle, andere sind reduziert (z.B. *rpl33*, *rpoA*, *petG*; Abb. 7B). Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass ein Fehlen von CP31A oder CP29A nicht mit einer generellen Reduktion von mRNA-Mengen einher geht, beide Proteine aber die Akkumulation einzelner RNAs positiv oder negativ beeinflussen können. Die Ergebnisse der qRT-PCRs wurden für einige RNAs, vornehmlich solche, die sowohl mit CP29A als auch mit CP31A interagieren, durch Northern-Analysen bestätigt (Abb. 13, Abb. 14A).

3.4 CP31A ist in die Stabilisierung der gespleißten *ycf3*- und der *ndhB*-mRNA involviert

Bisher wurden Funktionen von cpRNPs in der Edierung, Stabilisierung und Endprozessierung plastidärer mRNAs untersucht (Hayes et al., 1996; Hirose et al., 2001; Nakamura et al., 2001; Schuster und Gruissem, 1991; Tillich et al., 2009).

Neben diesen Prozessen ist das Spleißen von Introns ein weiterer zentraler Schritt der mRNA-Reifung. Um die Relevanz von CP31A und CP29A für das Herausschneiden von Intronsequenzen bei der mRNA-Reifung zu ermitteln, wurden qRT-PCRs mit allen chloroplastidären intronhaltigen mRNAs durchgeführt. Dabei waren die PCR-Primer so konstruiert, dass entweder ausschließlich das intronhaltige Transkript (dabei liegt ein Primer im Intron und der Gegenprimer innerhalb der kodierenden Sequenz), oder die gespleißte mRNA (hierbei liegen Primer und Gegenprimer in benachbarten Exons) amplifiziert wurde.

Intron 1-gespleißte *ycf3*-Transkripte (*ycf3* Exon1 Exon2 in Abb. 8) zeigen die deutlichste Reduktion (ca. 60% -70%) in *cp31a*-Mutanten gegenüber der Wildtyp-Kontrolle; diese geht allerdings nicht mit einer Überakkumulation Intron 1-haltiger Transkripte einher. Prozessierte *ndhB*-mRNAs sind ebenfalls auf ca. 40% -60% ihrer Abundanz im Wildtyp reduziert. Die Abundanz intronhaltiger Vorläufer ist dagegen unverändert.

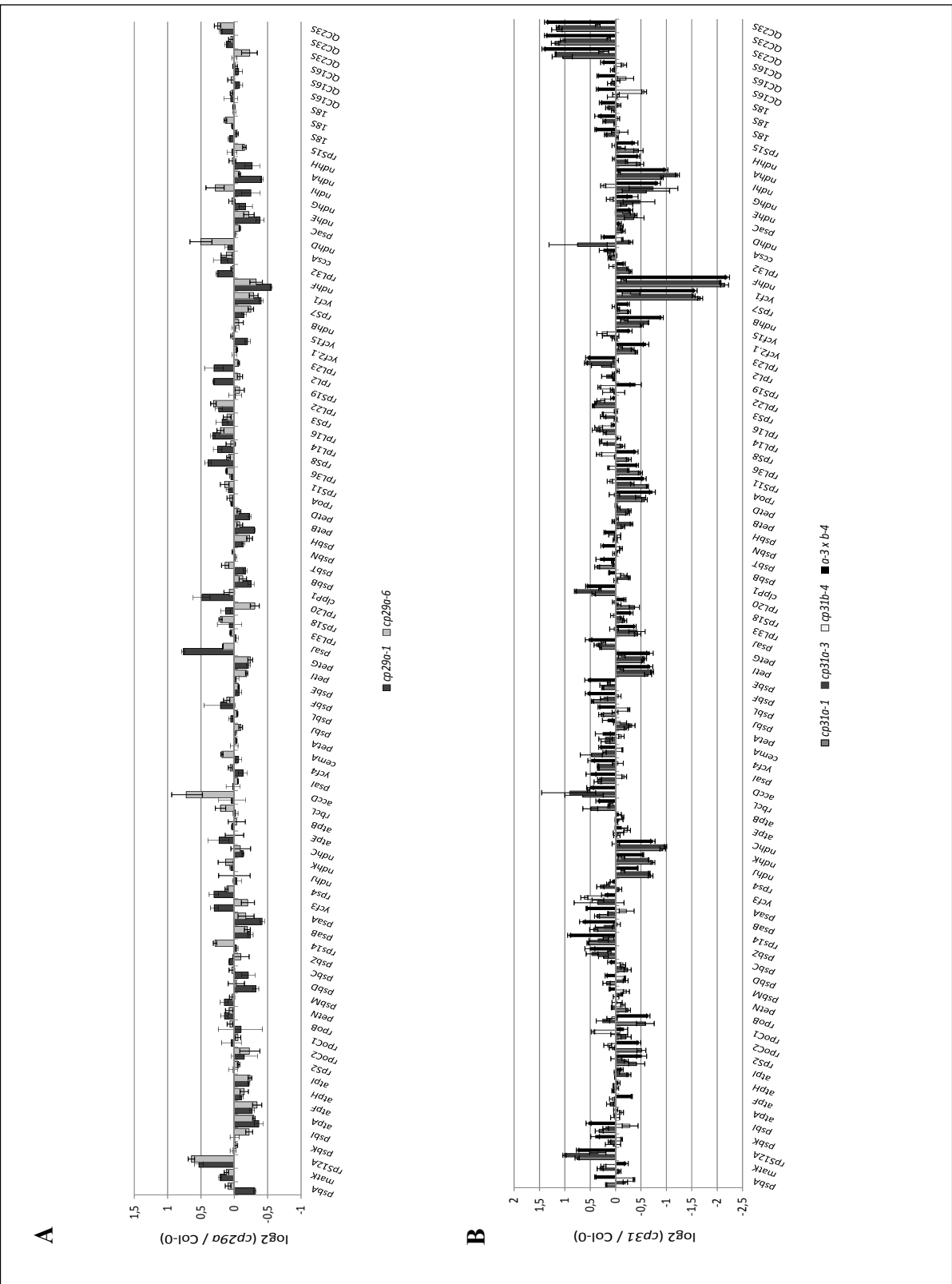


Abbildung 7 qRT-PCR-Analyse chloroplastidärer mRNAs in *cp29a*-Mutanten (**A**) und *cp31a*-Mutanten (**B**). Die Transkriptmengen sind als \log_2 (Logarithmus zur Basis 2) der Verhältnisse der mRNA-Quantitäten in den Mutanten zu denen im Wildtyp (Col-0) nach Normalisierung auf die Mutante/Wildtyp-Verhältnisse der Gesamtheit aller analysierten Plastiden-Gene, dargestellt. Die zytosolische 18S-rRNA dient als nicht-plastidäre Kontrolle.

In *cp29a*-Linien und in der *cp31a-3*-Mutante überakkumuliert das gespleißte *rps12*-Transkript; in *cp31a*-Linien ist darüber hinaus eine Überakkumulation der reifen *clpP*-mRNA zu beobachten (Abb. 8). Die Reduktion der reifen *ycf3*- und *ndhB*-Transkripte in *cp31a*-Mutanten konnten mittels Northern-Analyse bestätigt werden (Abb. 14).

Ein typischer Spleißdefekt sollte eine Überakkumulation des ungespleißten Vorläufers gegenüber einer Reduktion des gespleißten Transkripts zur Folge haben (s. z.B. De Longevialle et al., 2008). Die verminderte Akkumulation der gespleißten *ycf3*- und *ndhB*-mRNAs geht hier allerdings nicht mit einer solchen Überakkumulation der Vorläufer einher. Eine erhöhte Spleißeffizienz sollte wiederum zu einer Überakkumulation von gespleißten Transkripten und gleichzeitiger Reduktion nicht gespleißter Vorläufer führen. Im Fall der überakkumulierenden gespleißten *clpP*- und der *rps12*-Transkripte sind die Vorläufer aber nicht reduziert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass CP29A und CP31A nicht als Spleißfaktoren, sondern als Stabilisierungs-, bzw. Degradations-Faktoren für bestimmte gespleißte Transkripte fungieren.

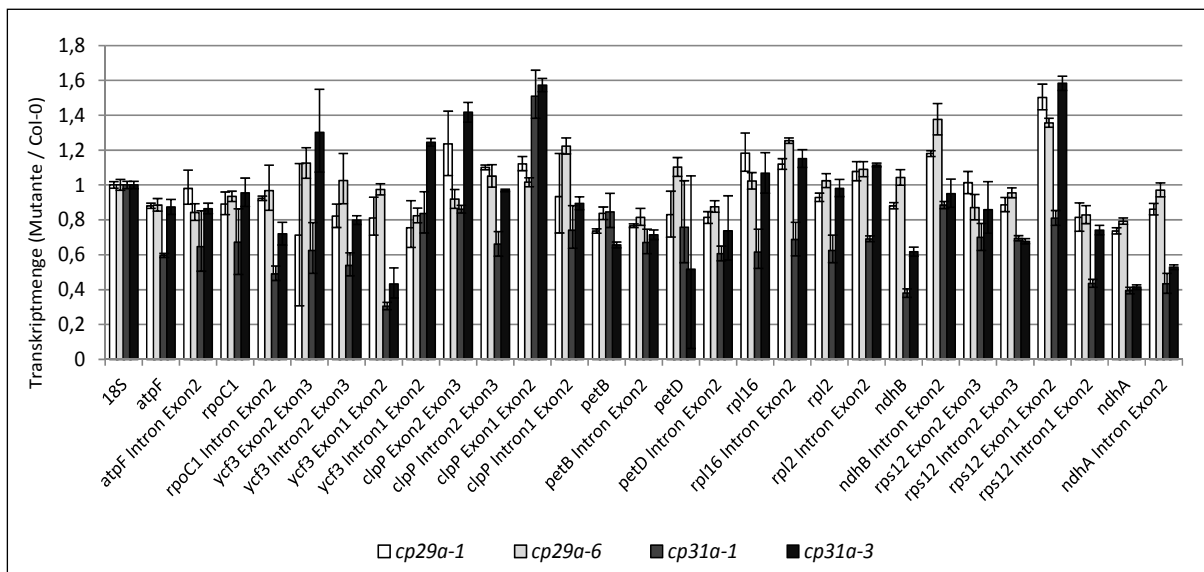


Abbildung 8 qRT-PCR-Analyse aller plastidären intronhaltigen mRNAs in *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten. Es wurden jeweils Intron-überspannende und Intron-beinhaltende PCR-Produkte amplifiziert, welche die Mengen der gespleißten und ungespleißten Transkripte repräsentieren. Die Transkriptmengen sind als \log_2 (Logarithmus zur Basis 2) der Verhältnisse der mRNA-Quantitäten in den Mutanten zu denen im Wildtyp (Col-0) dargestellt.

3.5 Unter Kältestress entwickeltes Gewebe ist in *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten chlorotisch

Einige cpRNPs werden lichtabhängig posttranslational modifiziert (Kleffmann et al., 2007; Wang et al., 2006). Um eventuelle phänotypische Veränderungen der *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten unter variierenden Lichtbedingungen zu untersuchen, wurden 12 Tage alte Einzel-

und Doppelmutanten, sowie der Wildtyp für einen Zeitraum von drei Wochen Starklicht-, bzw. Schwachlichtbedingungen ausgesetzt. Unter diesen Bedingungen konnten allerdings keine makroskopischen Abweichungen von gleichalten Wildtyp-Pflanzen beobachtet werden (Abb. 9).

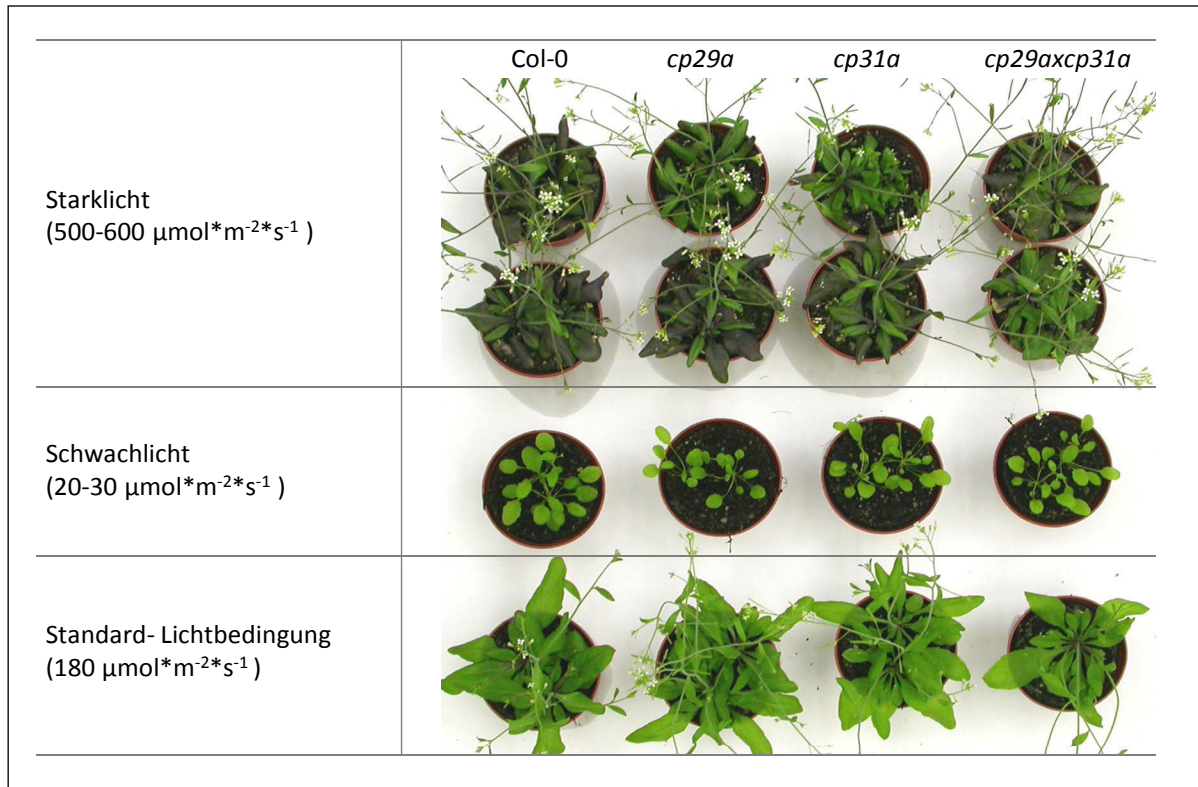


Abbildung 9 Phänotypen von *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten unter Stark- und Schwachlichtbedingungen. Nach 12 Tagen bei Standard-Wachstumsbedingungen wurden die Pflanzen Starklicht, Schwachlicht oder weiterhin Standard-Lichtbedingungen ausgesetzt.

Die Expression einiger Vertreter der cpRNP-Familie in Arabidopsis ist unter Kältestressbedingungen erhöht, wie aus *Microarray*-Daten hervorgeht (zusammengefasst in Ruwe et al., 2011). Deshalb wurden drei Wochen alte unter Standard-Temperatur angezogene Einzel-, Doppel- und Tripelmutanten einem 18 Tage andauernden Kältestress (8 °C) ausgesetzt (Abb. 10A). Das unter diesen Bedingungen gebildete Blattgewebe ist bleich, während älteres Gewebe seine grüne Färbung behält. Doppel- und Tripelmutanten zeigten eine wesentlich stärker ausgeprägte Chlorose des jungen Gewebes als die Einzelmutanten, unterscheiden sich voneinander aber kaum (Abb. 10A).

Zusätzlich wurde die Keimung der Mutanten unter diesen Bedingungen beobachtet. Die Keimung und Entwicklung aller Mutanten erfolgte im Vergleich zu Col-0-Individuen verzögert. Die gebildeten Kotyledonen waren zunächst in allen Mutanten bleich, ergrüneten

aber in den Einzelmутanten und der Doppelmутante im Zuge ihrer Expansion. Einzel- und Doppelmутanten sind außerdem in der Lage, unter andauerndem Kältestress Sekundärblätter auszubilden, die einen hellgrünen Phänotyp entwickeln (Abb. 10B, unten). In der Tripelmутante arretierten die Keimblätter früh in ihrer Entwicklung und waren auch nach fünf Wochen klein, bleich oder gänzlich weiß (Abb. 10B). Das Fehlen von zwei oder drei cpRNPs (in *cp29a* x *cp31a*- und *cp29a* x *cp31a* x *cp31b*) führt hier zu einer graduellen Verstärkung des beobachteten Phänotyps (Abb. 10B).

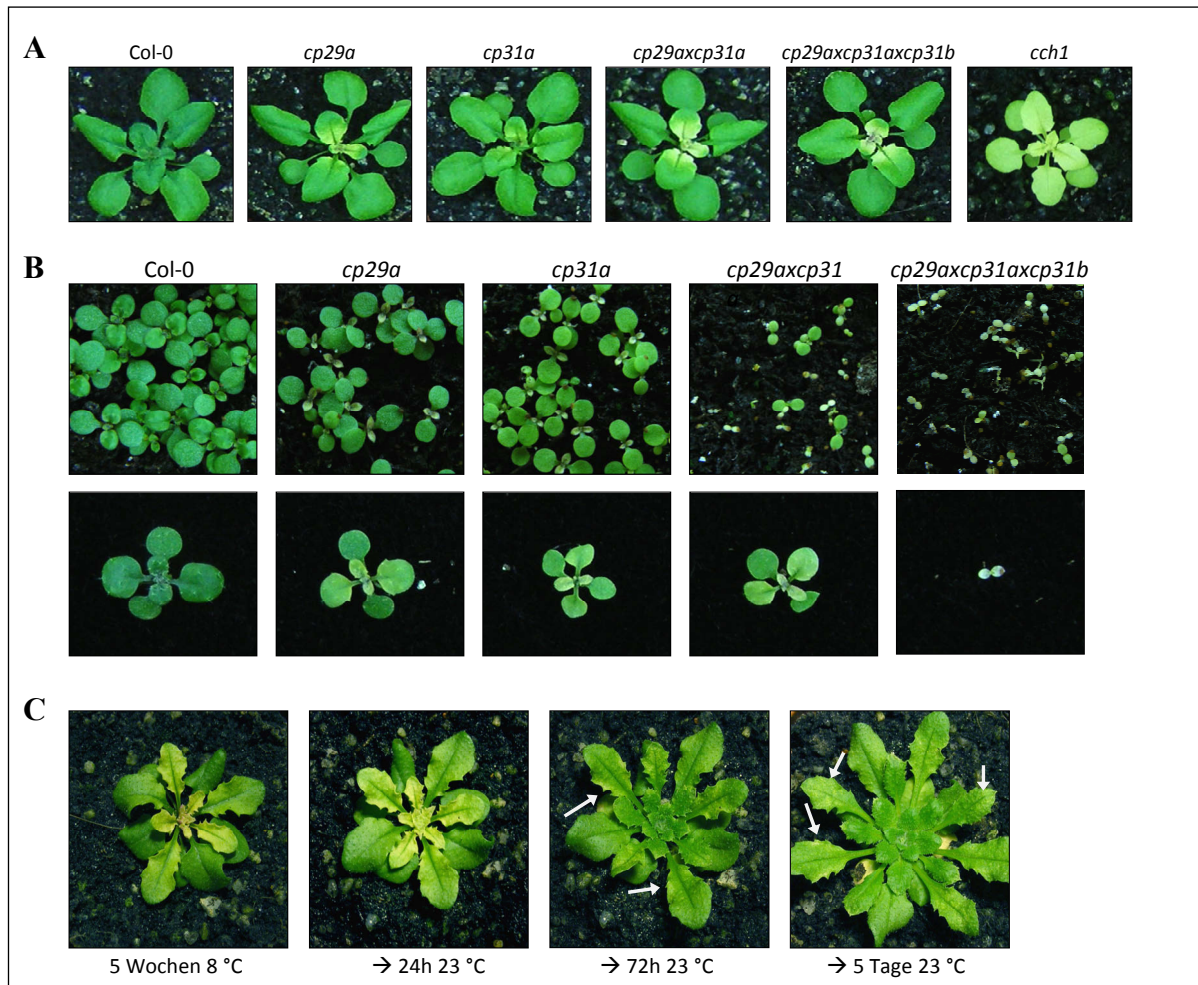


Abbildung 10 Phänotypen der cpRNP-Einzel-, Doppel- und Tripelmутanten unter Kältestress. **(A)** Nach 18 Tagen bei 23 °C wurden die Pflanzen einem dreiwöchigen Kältestress von 8 °C ausgesetzt. *cch1*, eine Chlorophyll-Biosynthese-Mutante, zeigt einen ähnlichen Grad der Ausbleichung und wird deshalb als Kontrolle für folgende Northern- und Western-Analysen verwendet. **(B)** Samen der Mutanten wurden unter Kältestress (8 °C) gekeimt und die Phänotypen nach drei Wochen (oben) und fünf Wochen (unten) überprüft. **(C)** Nach fünf-wöchigem Kältestress wurde eine der *cp29a* x *cp31a*-Mutanten wieder Standard-Temperaturbedingungen (23 °C) ausgesetzt und ihre phänotypische Entwicklung nach einem, drei und fünf Tagen dokumentiert. Weiße Pfeile markieren einige chlorotische Abschnitte, welche auch nach drei-, bzw. fünftägigem Wachstum bei 23 °C noch nachweisbar waren.

Um festzustellen, ob das Ausbleichen des unter 8 °C gebildeten Gewebes reversibel ist, wurden für einen Zeitraum von fünf Wochen kältegestresste *cp29a* x *cp31a*-Pflanzen erneut Standard-Wachstumsbedingungen ausgesetzt. 24 Stunden nach der Temperaturveränderung konnte noch keine Veränderung des Phänotyps detektiert werden. Nach 72 Stunden konnte dagegen die rapide Expansion und Neubildung von Blättern beobachtet werden. Jedoch blieben auch nach 5 Tagen unter normalen Temperaturbedingungen einige chlorotische Bereiche in den Blättern erhalten (Abb. 10C). Dies weist darauf hin, dass in einigen Zellen eine länger andauernde oder irreversible Schädigung der unter Kälte entwickelten Chloroplasten vorliegt, während andere ihre photosynthetische Aktivität innerhalb von 72 Stunden regenerieren können.

3.6 Die Expression von CP29A wird durch Kältestress induziert

Da auf RNA-Ebene erhobene *Microarray*-Daten (Übersicht in Ruwe et al., 2011) auf eine erhöhte Expression von CP29A unter Kältestress hinweisen, wurden Western-Analysen durchgeführt, um dies auf Proteinebene zu belegen. Wildtyp-Pflanzen wurden für zwei Wochen bei 23 °C angezogen und dann bis zu fünf Tagen einem Kältestress von 8 °C ausgesetzt. *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten zeigen innerhalb dieses Zeitraums noch nicht den nach einer längeren Kälteperiode beobachteten chlorotischen Phänotyp. Vor Beginn der Kältebehandlung, sowie nach einem, zwei, drei und fünf Tagen Kältestress wurden jeweils die vier jüngsten Blätter der Pflanzen geerntet und Western-Analysen unterzogen. Nach drei, bzw. fünf Tagen Kältestress ist die Menge von CP29A im Vergleich zu seiner Akkumulation vor der Applikation des Kältestresses um ca. 50% erhöht. Die statistische Relevanz dieser Differenz wurde durch einen Student-T-Test aus drei unabhängigen Experimenten belegt (Abb. 11A). Als Referenz diente hierbei die Expression des mitochondrialen Proteins COX II (Untereinheit 2 der Cytochrom c Oxidase).

Die Expression von CP31A wird, konsistent mit den verfügbaren *Microarray*-Daten (Ruwe et al., 2011), nicht von dieser Veränderung der Temperaturbedingungen beeinflusst (Abb. 11, rechts). Trotz der Überlappung vieler Ziel-mRNAs sowie ähnlicher Phänotypen der *cp29a*- und *cp31a*-Nullmutanten unter Kältestress werden CP29A und CP31A also unterschiedlich reguliert.

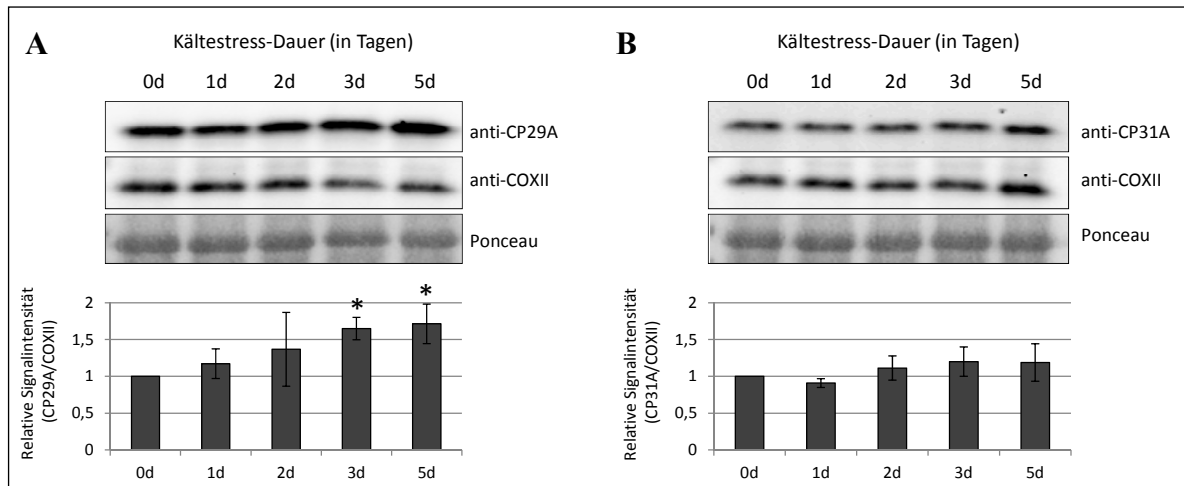


Abbildung 11 Western-Analysen der Expression von CP29A und CP31A unter Kältestress. 2 Wochen alte Arabidopsis-Pflanzen wurden einem Kältestress von 8 °C ausgesetzt. Die jeweils vier jüngsten Blätter wurden vor sowie 1, 2, 3 und 5 Tage nach der Kältebehandlung geerntet. Gleiche Proteinmengen wurden in SDS-PA-Gelen elektrophoretisch getrennt und einer Western-Hybridisierung mit anti-CP29A-(links) und anti-CP31A-Antikörpern (rechts) unterzogen. Ein Ausschnitt der Ponceau-S-Färbung zeigt RbcL und belegt die Vergleichbarkeit der eingesetzten Proteinmengen. Die unten stehenden Graphiken zeigen die relative Signalintensitäten von CP29A (links), und CP31A (rechts) im Vergleich zu dem mitochondrialen Protein COXII. Standardabweichungen wurden aus drei biologischen Replikaten ermittelt. Sternchen markieren Signale, deren Abweichungen im Vergleich zu 0 Tagen Kältestress in einem zweiseitigen, gepaarten Student-T-Test aus drei biologischen Replikaten statistisch relevant ($p < 0,05$) waren. $p(3d) = 0,018$; $p(5d) = 0,044$.

3.7 Photosynthetische Proteine sind im bleichen Gewebe der *cpRNP*-Mutanten reduziert

Da der bleiche Phänotyp der untersuchten Mutanten unter Kältestress auf eine verminderte photosynthetische Aktivität hindeutet, wurde die Akkumulation der Photosynthesekomplexe analysiert. Dafür wurden Western-Analysen jeweils einer repräsentativen Untereinheit der vier Komplexe des Photosyntheseapparats in *cp29a*-, *cp31a*-Mutanten und *cp29a* x *cp31a*-Doppelmutanten durchgeführt. Es wurden Antikörper verwendet, die AtpA, die α -Untereinheit des beweglichen F1-Bereichs der ATP-Synthase, D1, eine Untereinheit des Reaktionszentrums von Photosystems II, PetD, die Untereinheit IV des Cytochrom-b6f-Komplexes, PsdA, eine kernkodierte periphere Untereinheit von Photosystem I, sowie PsbP, eine im Kern kodierte extrinsische Untereinheit des Photosystems II, spezifisch binden. Als Kontrolle dienten gleiche Mengen eines Col-0-Proteinextraktes, sowie dessen Verdünnungen auf 50% und 10%.

Unter normalen Temperaturbedingungen sind die Akkumulationen aller untersuchten Proteine mit denen im Wildtyp vergleichbar. In dem unter Kältestress gebildeten Blattgewebe sind diese Proteine dagegen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen um deutlich mehr als 50%

reduziert (Abb. 12). Die Reduktion ist in der *cp29a* x *cp31a*-Mutante jeweils stärker ausgeprägt als in den Einzelmутanten; die Menge des PsaD-Proteins befindet sich in Doppelmutanten sogar unterhalb der Detektionsgrenze (Abb. 12). In der phänotypisch sehr ähnlichen *cchl*-Mutante ist ebenfalls eine verminderte Akkumulation aller analysierten Untereinheiten zu beobachten, die allerdings, mit Ausnahme von PsbP, im Vergleich zu den untersuchten cpRNP-Mutanten weit weniger ausgeprägt ist und nicht mehr als 50% der Proteinmengen im Wildtyp beträgt (Abb. 12).

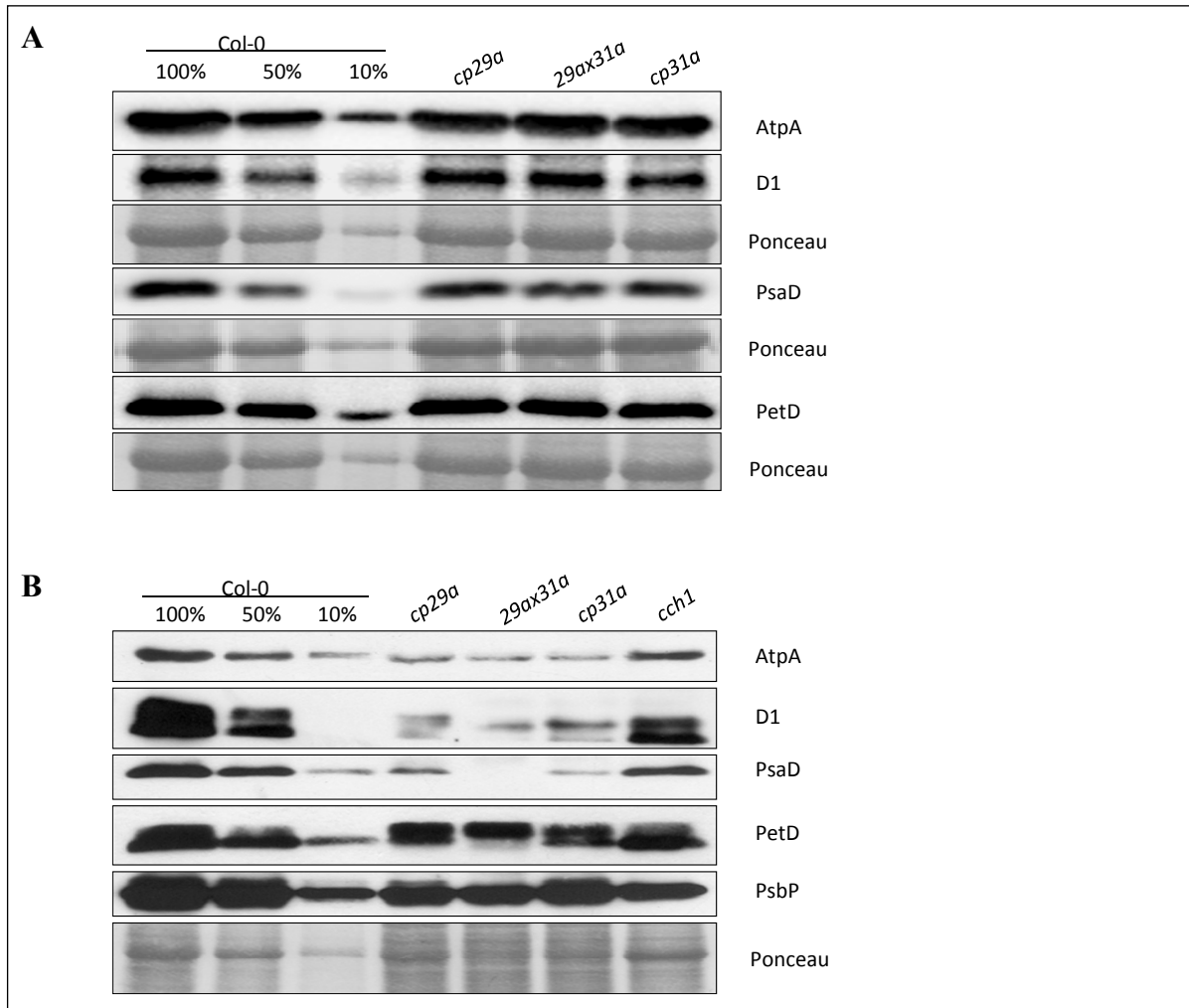


Abbildung 12 Western-Analyse von Untereinheiten der vier Komplexe des Photosyntheseapparats. **(A)** Proteinakkumulation in drei Wochen alten *cp29a*- und *cp31a*- Einzel- und Doppelmutanten, im Vergleich zu dessen Akkumulationen in puren, 1:2 und 1:10 verdünnten Wildtyp-Proteinextrakten (Col-0). **(B)** Proteinakkumulation in chlorotischen Blattabschnitten nach 3 Wochen Kältestress in *cp29a*- und *cp31a*- Einzel- und Doppelmutanten. Es wurden die Akkumulationen von AtpA (ATP-Synthase-Komplex), D1 und PsbP (PS II), PsaD (PS I) und PetD (Cytochrom b6f-Komplex) in den Mutanten im Vergleich zum Wildtyp geprüft. Ein Ausschnitt der Ponceau-S-Färbung (Ponceau), belegt die Vergleichbarkeit der eingesetzten Proteinmengen.

3.8 PEP-abhängige Transkripte sind in den chlorotischen Blattabschnitten reduziert

Um aufzuklären, ob die verringerte Proteinakkumulation auf reduzierte Transkriptmengen zurückzuführen ist, wurden Northern-Analysen mit kältegestressten, chlorotischen Blattgeweben durchgeführt. Dabei fiel auf, dass alle untersuchten mRNAs, die von der plastidär kodierten RNA-Polymerase (PEP) transkribiert werden, in beiden Einzelmutanten und jeweils stärker in *cp29a*-Mutanten reduziert waren (Abb. 13), während sich NEP-Transkripte nicht reduziert zeigten (Abb. 14). 16S- und 23S-Transkripte, die in Arabidopsis ebenfalls hauptsächlich von der PEP transkribiert werden, wiesen dagegen zwar Prozessierungsdefekte auf (s. 3.9.5; Abb. 15), sind aber insgesamt gegenüber dem Wildtyp nicht reduziert. In *cch1*-Mutanten, die auf Grund eines Defekts innerhalb der Chlorophyll-Biosynthese bereits unter Standard-Wachstumsbedingungen eine schwächere Pigmentierung als Wildtyp-Pflanzen aufweisen, sind die in *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten beobachteten Transkript-Reduktionen nicht vorhanden (Abb. 13A).

3.9 RNA-Prozessierungsdefekte in *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten unter Kältestress

Neben der generellen Reduktion vieler Transkripte konnten einige Prozessierungsdefekte in den untersuchten Mutanten identifiziert werden. Es sind Spleißprozesse von *ycf3*-, *ndhB*- und *rpoC1* und Schnitte innerhalb des tricistronischen *psaJ-rpl33-rps18*-Transkripts, sowie in 16S- und 23S-rRNAs betroffen.

3.9.1 *rpoC1* wird in *cp29a*-Mutanten nicht korrekt prozessiert

Während alle anderen hier untersuchten NEP-abhängigen Transkripte in *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten unter Kältestress auf Wildtyp-Niveau akkumulieren, sind *rpoC1*-haltige RNA-Spezies, die ebenfalls NEP-abhängig transkribiert werden (Hajdukiewicz et al., 1997), im Vergleich zu Col-0-Pflanzen klar abundanter. Weiterhin ist in *cp29a*-Mutanten die Überakkumulation zweier ca. 2,9 kb und 2,6 kb großer intronhaltiger Vorläufer im Vergleich zum gespleißten 2,3 kb großen *rpoC1*-Transkripts zu beobachten (Abb.14; für die Zuordnung der gespleißten und ungepleißten Formen, siehe auch Asakura und Barkan, 2006). Eine Quantifizierung der Spleißeffizienz (das Verhältnis des gespleißten *rpoC1* zu intronhaltigen *rpoC1*-Transkripten) zeigt, dass in *cp29a*-Mutanten bereits unter Standardbedingungen ein Spleißdefekt von ca. 20% vorliegt. In den kältegestressten Geweben ist dieser Defekt leicht erhöht und beträgt ca. 25%. In *cp31a*-Mutanten ist die *rpoC1*-Spleißeffizienz unter

Standardtemperatur, sowie unter Kältestress dagegen nur leicht (ca. 5%) reduziert (Abb. 14C). Die erwähnte Überakkumulation aller *rpoCI*-Spezies unter Kältestressbedingungen führt allerdings zu vergleichbaren Abundanzen der reifen *rpoCI*-mRNA im Wildtyp und in der Mutante. Durch diesen Effekt kann eine Funktion von CP29A als *rpoCI*-Spleißfaktor unter Kältestress nicht eindeutig belegt werden. CP29A könnte alternativ die Degradation nicht gespleißter *rpoCI*-Vorläufer bewirken.

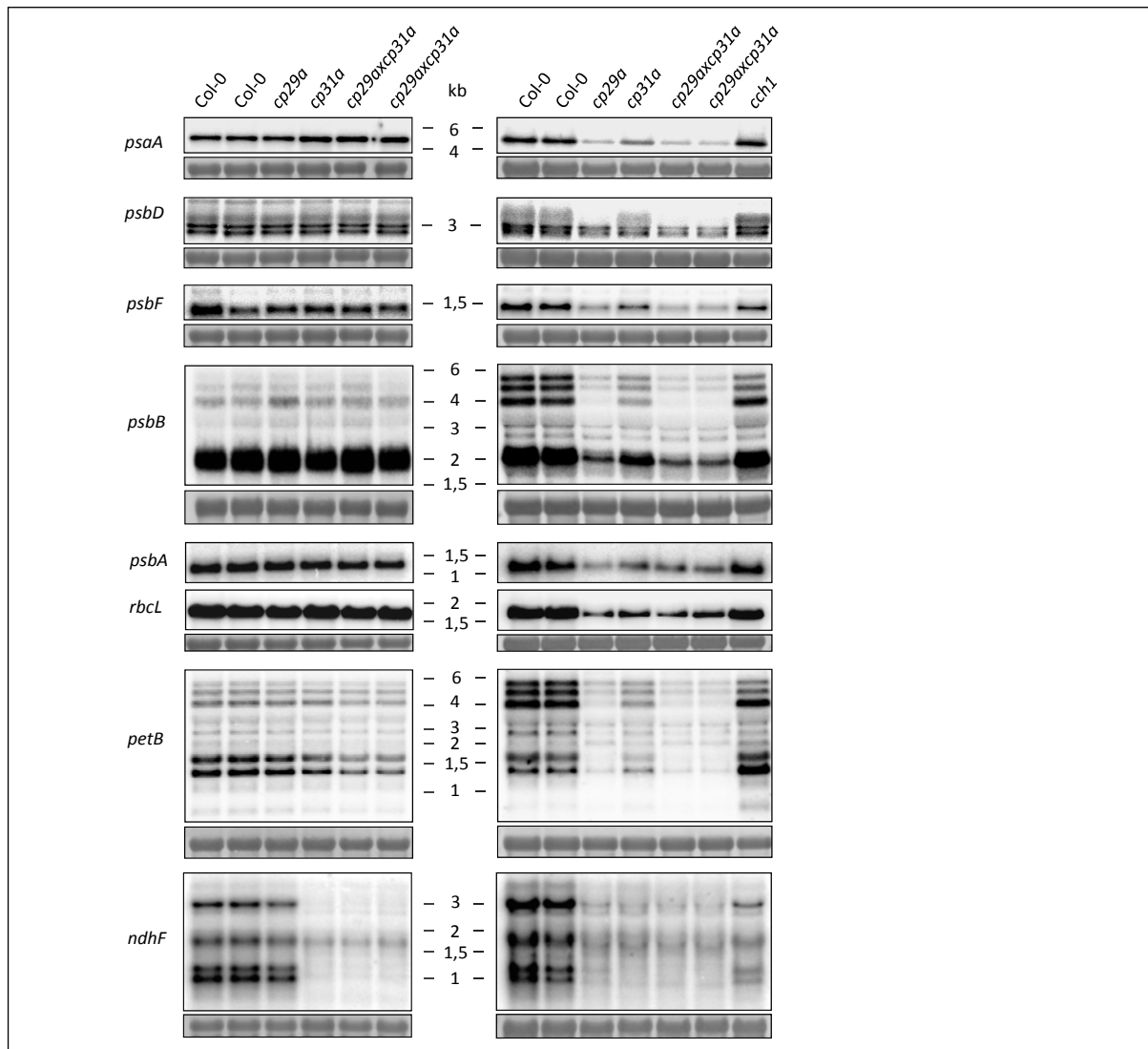


Abbildung 13 Northern-Analyse von PEP-abhängigen Transkripten unter Kältestress-Bedingungen. Die Transkript-Akkumulation in *cp29a*- und *cp31a*- Einzel- und Doppelmутanten, die für drei Wochen unter Standard-Bedingungen (23 °C) angezogen wurden, bzw. einem dreiwöchigen Kältestress (8 °C) ausgesetzt waren, wurde mit denen im Wildtyp verglichen (Col-0). Nach der Kältebehandlung wurden nur die chlorotischen Blattabschnitte der Mutanten, sowie Blattmaterial vergleichbaren Alters des Wildtyps geerntet. Ein Ausschnitt der Methylenblau-Färbung (25S rRNA) dient als Beladungskontrolle.

3.9.2 Die Prozessierung der *ycf3*-mRNA ist unter Kältestress defizitär

Da die *ycf3*-mRNA bereits unter normalen Temperaturbedingungen in *cp31a*-Mutanten reduziert ist (Abb. 8), wurde die Akkumulation dieses Transkripts auch unter Kältestress analysiert: In kältegestressten, in den Mutanten chlorotischen, Gewebeabschnitten zeigen *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten voneinander verschiedene vom Wildtyp abweichende *ycf3*-Transkript-Muster. In *cp29a*-Mutanten ist eine deutliche Reduktion des monocistronischen gespleißten *ycf3*-Transkripts zu beobachten, während dieses in der *cp31a*-Mutante auf Wildtyp-Niveau akkumuliert. Nicht prozessierte Vorläufer-Spezies sind dagegen in verschiedenem Maße überakkumuliert. Die Abundanz des monocistronischen ungepleißten *ycf3*-Transkripts ist in *cp29a*-Mutanten gegenüber dem Wildtyp um ca. 90% erhöht (Transkript III, Abb. 14A + B). Die monocistronische Intron2-gespleißte *ycf3*-mRNA (Transkript IV, Abb. 14A + B) erhebt sich indessen nur wenig über das Wildtyp-Niveau. In *cp31a*-Mutanten zeigt die Intron 2-gespleißte dicistronische *rps4-ycf3*-mRNA, verglichen mit dem Wildtyp, die stärkste Überakkumulation (um ~120%; Transkript II, Abb. 14A + B), während diese in *cp29a*-Mutanten nur um ca. 20% erhöht ist. Insgesamt sind jedoch in beiden Mutanten alle intronhaltigen Vorläufer angereichert. Diese Ergebnisse lassen auf eine Rolle der untersuchten cpRNPs in Degradationsprozessen nicht gespleißter *ycf3*-Transkripte schließen. Dabei könnte die Interaktion von CP29A und CP31A mit verschiedenen Bereichen der *ycf3*-mRNA für die unterschiedlichen Akkumulationen von Vorläufer-Transkripten in den untersuchten Mutanten verantwortlich sein. CP29A scheint darüber hinaus eine Funktion in der Stabilisierung der reifen *ycf3*-mRNA, und/oder im Spleißprozess des *ycf3*-Intron 1 zu besitzen.

Da *ycf3* für einen Interaktionspartner der Photosystem I-Untereinheiten PsaA und PsaD kodiert (Petersen et al., 2011), kann inkorrekte Prozessierung des Transkripts Defekte im Aufbau des Photosyntheseapparats bewirken und damit Wachstums- und Pigmentierungsstörungen verursachen. Petersen und Mitarbeiter (2011) konnten zeigen, dass inkorrektes Spleißen des zweiten *ycf3*-Introns in Tabakpflanzen unter ähnlichen Kältestress-Bedingungen tatsächlich eine Chlorose junger Gewebe hervorruft.

3.9.3 In *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten ist das Spleißen des *ndhB*-Introns reduziert

Prozessierte *ndhB*-Transkripte sind, wie *ycf3*, in qRT-PCR-Analysen unter Standard-Bedingungen in *cp31a*-Mutanten reduziert. Im Northern ist unter diesen Bedingungen darüber hinaus eine Überakkumulation eines ca. 0,7 kb großen Transkripts zu beobachten. Diese RNA kann aufgrund ihrer geringen Größe nicht das gesamte Leseraster kodieren. Es könnte sich bei

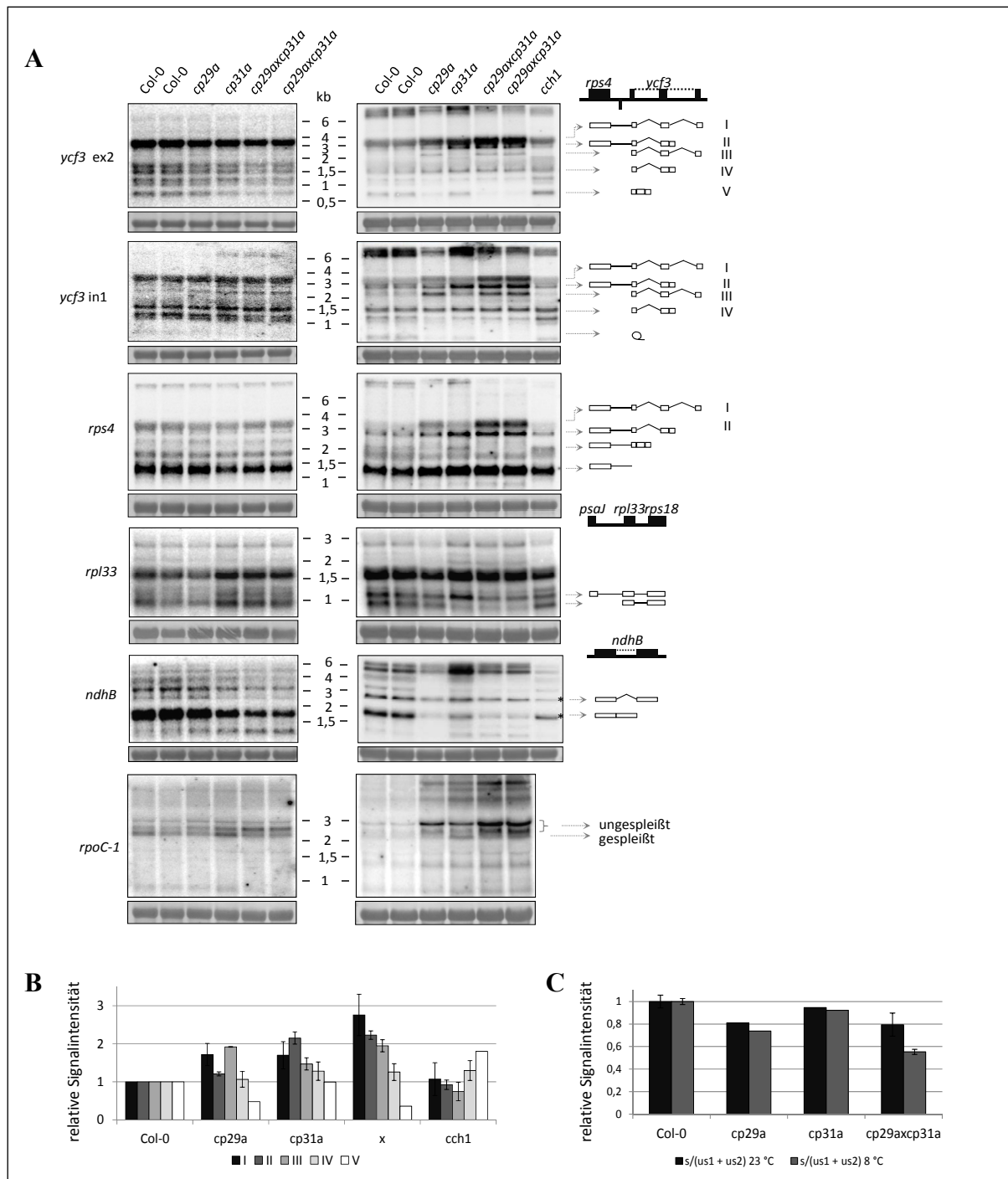


Abbildung 14 (A) Northern-Analyse NEP-abhängig transkribierter mRNAs unter Standard- und Kältestress-Bedingungen. Die detektierten Signale sind den verschiedenen prozessierten mRNA-Spezies zugeordnet (Genkarten, rechts). **(B)** Quantifizierung der Transkriptakkumulationen in *ycf3*-Exon 2- und Intron 1- Northern-Hybridisierungen. Für die Quantifizierung der Transkripte I-IV wurden die Signale der *ycf3*-Exon 2- und Intron 1- Hybridisierungen verwendet, Standardabweichungen der beiden Datensätze sind eingezeichnet. Da die reife *ycf3*-mRNA (Transkript V) nur mit der *ycf3*-Exon 2-Sonde detektiert wurde, konnte hier nur ein Datensatz abgebildet werden. **(C)** Quantifizierung der *rpoC1*-Spleißeffizienz. Das Verhältnis der Menge des gespleißten Transkripts (s) zu der Summe der zwei nicht gespleißten Transkripte (us1 + us2) ist dargestellt. Für Col-0 und *cp29a* x *cp31a* sind Standardabweichungen eingezeichnet, da hier jeweils zwei Replikate analysiert wurden.

dieser Spezies um ein Abbauprodukt des reifen *ndhB*-Transkripts handeln, welches auf Grund fehlender Stabilisierung durch CP31A entsteht. Unter Kältestress-Bedingungen sind *ndhB*-haltige Transkripte in allen untersuchten CP29A-defizitären Mutanten, sowie in der *cch1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp drastisch reduziert. Das gespleißte *ndhB*-Transkript ist allerdings im Gegensatz zu intronhaltigen Vorläufern in *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten auch im Vergleich zur *cch1*-Mutante deutlich reduziert. Dies weist auf eine Funktion beider Proteine innerhalb des Intron-Spleißens der *ndhB*-mRNA unter Kälte hin. Desweiteren überakkumulieren zwei 5,8 kb und 6,2 kb große Transkripte in der *cp31a*-Einzelmutante.

3.9.4 *rpl33* ist in *cp31a*-Mutanten unter Kältestress reduziert

Rpl33 kodiert für eine Proteinkomponente der großen ribosomalen Untereinheit und ist unter Standard-Anzuchtbedingungen nicht essentiell (Rogalski et al., 2008). Das Fehlen von Rpl33 führt allerdings nach lang andauerndem Kältestress zu einer drastischen Reduktion der plastidären Translation (Rogalski et al., 2008). Zwar wurde die *rpl33*-mRNA nicht als einer der hauptsächlichen Interaktionspartner von CP29A und CP31A identifiziert, sie ist aber dennoch in den RIP-Chip- und *Dot-Blot*-Analysen deutlich angereichert (Abb. 5A und 5B). Auf Grund des beobachteten Phänotyps in *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten unter Kältestress-Bedingungen wurde eine Northern-Analyse der *rpl33*-mRNA durchgeführt. Während die hierbei detektierten Transkripte unter Standard-Bedingungen (23 °C) vergleichbar mit Col-0-Pflanzen akkumulieren, ist nach Kältestress in *cp31a*-, jedoch nicht in *cp29a*-Mutanten, eine deutliche Reduktion eines 0,7 kb großen Transkripts, welches wahrscheinlich neben *rpl33* auch *rps18* beinhaltet, zu beobachten (Abb. 14A). Ein ca. 1,2 kb großes Transkript, welches sich vermutlich aus *rpl33*, *rps18* und *psaJ* zusammensetzt, ist dagegen im Vergleich zum Wildtyp überrepräsentiert. Diese Beobachtungen weisen auf eine reduzierte Effizienz eines exo- oder endonukleolytischen Schnittes zwischen *rps18-rpl33* und *psaJ* in *cp31a*-Mutanten unter Kältestress hin. Eine monocistonische *rpl33*-mRNA konnte weder in Col-0-Pflanzen noch in den Mutanten nachgewiesen werden.

3.9.5 Die Prozessierung der 23S- und der 16S-rRNA ist in *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten fehlerhaft

Die Prozessierung von *rrn16* und *rrn23* ist in den kältegestressten, chlorotischen Blattabschnitten in *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten defizitär. Northern-Hybridisierungen mit einer 16S-rRNA-Sonde zeigten eine leichte Überakkumulation eines *rrn16*-Vorläufers von 1,7 kb, welcher vermutlich ein verlängertes 3'-Ende besitzt (Bollenbach, 2005; Abb. 15A).

Die 23S-rRNA liegt während der Ribosomenassemblierung zunächst als dicistronisches 23S-4,5S-Transkript vor. Im Ribosom erfolgt dann die Prozessierung in monocistronische 23S- und 4,5S-rRNA und die weitere Spaltung der *rrn23* in drei Teile von 1,3 kb, 1,1 kb und 0,5 kb (Keus et al., 1984; Bellaoui et al., 2003; Nishimura, 2010).

In den *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten ist die nicht prozessierte 2,9 kb große 23S-rRNA, sowie ein 2,4 kb großes Prozessierungs-Intermediat überrepräsentiert, während die 1,3 kb und 1,1 kb großen Bruchstücke, sowie eine Zwischenform von 1,8 kb stark reduziert sind. Die Akkumulation des 0,5 kb großen Bruchstücks ist nicht beeinflusst (Abb. 15B). Ein sehr ähnlicher 23S-rRNA-Defekt ist z.B. in Arabidopsis-*knockout*-Linien der RNA-Helikase RH39 gezeigt worden (Nishimura, 2010) und geht dort mit einer deutlich reduzierten Akkumulation chloroplastidärer Proteine, Wachstumsverzögerung und einem blassgrünen Phänotyp einher.

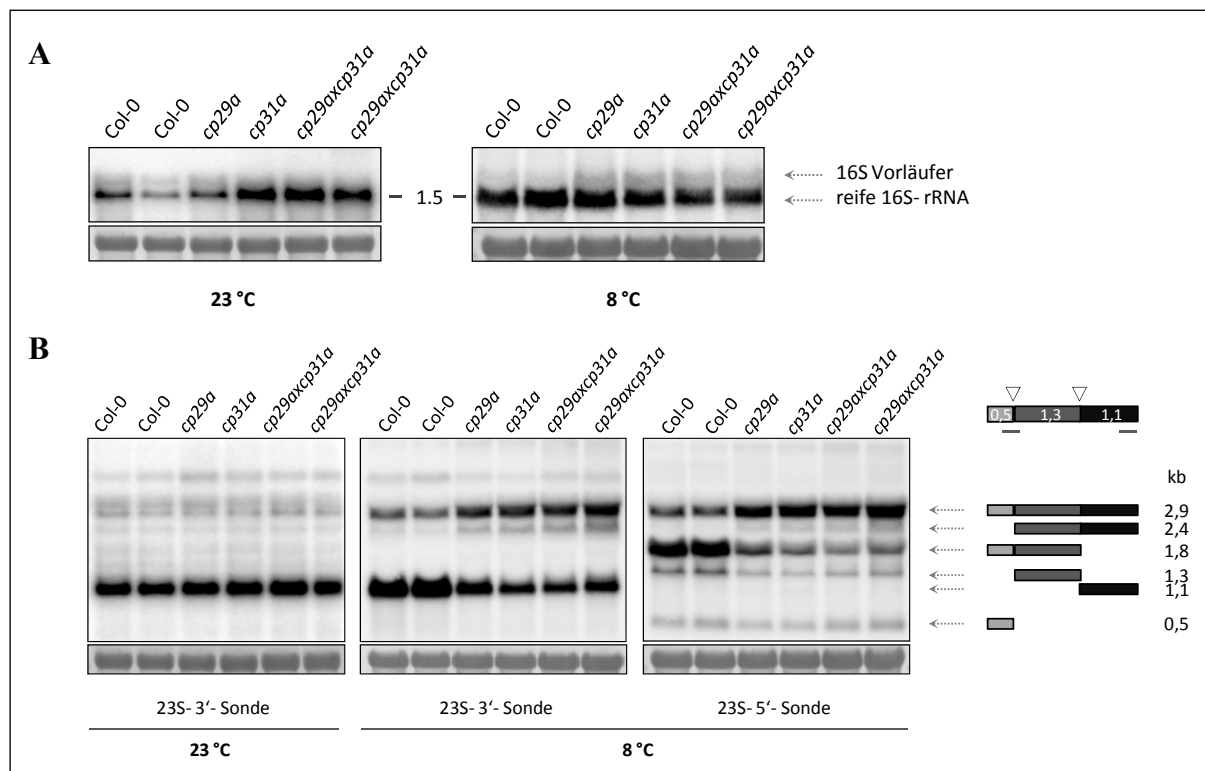


Abbildung 15 Northern-Analyse der 16S- und 23S-rRNA-Prozessierung unter Kältestress. Die rRNA-Akkumulation in drei Wochen alten unter Standard-Bedingungen angezogenen (23 °C), sowie die in chlorotischen Blattabschnitten von kältegestressten (8 °C) *cp29a*- und *cp31a*-Einzel- und Doppelmutanten wird mit dessen Akkumulationen im Wildtyp verglichen (Col-0). In (A) ist die Akkumulation der reifen 16S-rRNA, sowie eines nicht endprozessierten 16S-rRNA-Vorläufers gezeigt. In (B) ist die Prozessierung der monocistronischen 23S-rRNA dargestellt. Die Lage der 23S-5'- und 3'-Sonden ist in einer 23S-Transkriptkarte (rechts oben) eingezeichnet. Weiße Dreiecke repräsentieren zwei Prozessierungsstellen (*hidden breaks*) innerhalb der 23S-rRNA. Die detektierten Signale sind den verschiedenen prozessierten 23S-rRNA-Spezies zugeordnet (rechts). Ein Ausschnitt der Methylengrün-Färbung (28S rRNA) dient als Beladungskontrolle.

3.10 Die Rate der plastidären Transkription ist in *cp29a*-Mutanten nicht beeinflusst

Da in *cp29a*-Mutanten bereits unter Standard-Wachstumsbedingungen eine ca. 20%ige Reduktion im Spleißen der *rpoC1* Intronsequenz beobachtet werden konnte (Abb. 14A und C), wurden die Transkriptionsraten einiger plastidärer Gene mittels der sogenannten *Run-on*-Technik analysiert. In isolierten, noch intakten Chloroplasten erfolgte eine 15 minütige Transkription in Anwesenheit von ^{32}P -markiertem UTP. Die radioaktiv markierten Transkripte wurden anschließend extrahiert und auf Nylon-Membranen hybridisiert, auf denen sich jeweils gleiche Mengen von PCR-Produkten plastidärer Gene befanden (Zubo und Kusnetsov, 2008). Diese Membranen sowie intensive technische Unterstützung wurden freundlicherweise durch Dr. Maria Yamburenko gestellt. Der Vergleich zwischen zwei biologischen Replikaten der *cp29a-1*-Mutante und insgesamt fünf Col-0 Replikaten ergab keine statistisch relevanten Unterschiede (Abb. 16). Die plastidäre Transkription findet also in *cp29a*-Mutanten, zumindest unter Standard-Wachstumsbedingungen, trotz eines leichten Spleißdefekts der PEP-Untereinheit *rpoC1* uneingeschränkt statt.

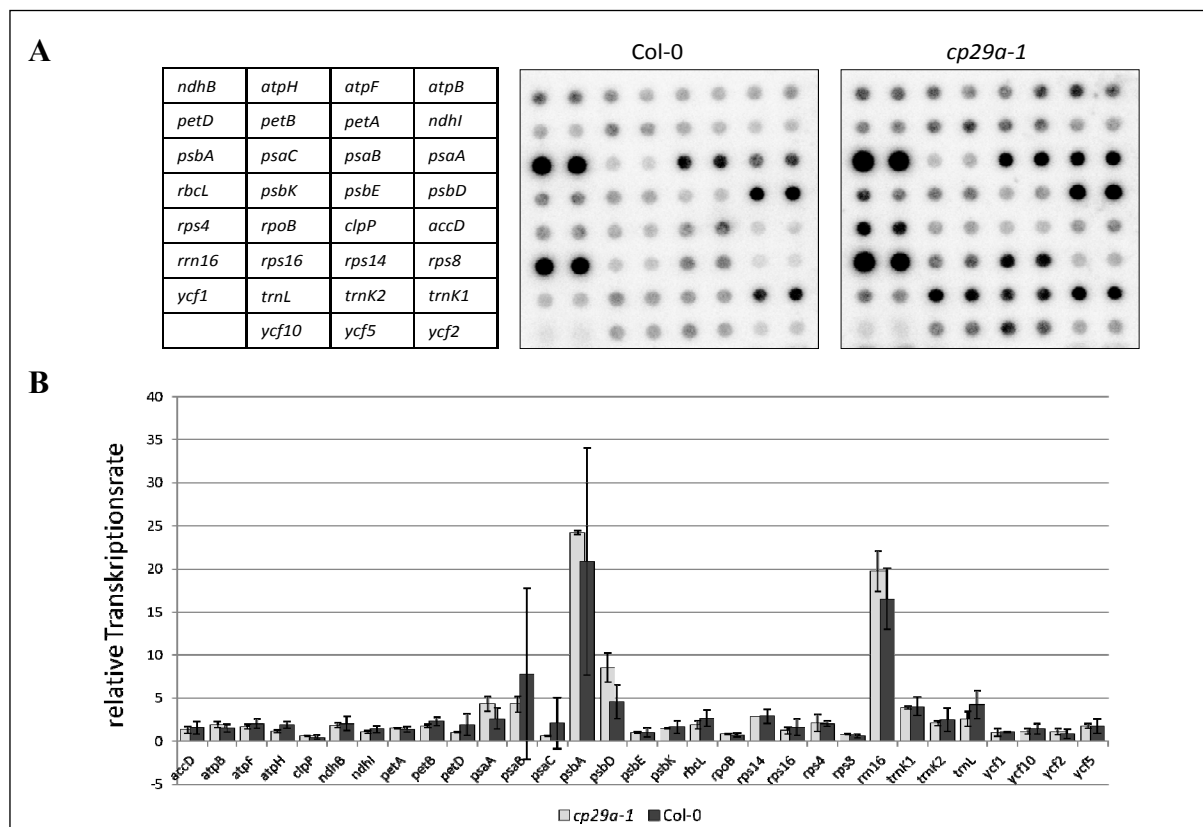


Abbildung 16 *Run-on* Transkription in zwei Wochen alten Col-0 und *cp29a*-Chloroplasten: Durch Zugabe von ^{32}P -markierten Ribonukleotiden zu isolierten Chloroplasten und anschließende Hybridisierung mit PCR-Produkten, die 31 verschiedene Chloroplastengene repräsentieren, wurden die Transkriptionsraten dieser Gene ermittelt.

3.11 CP29A und CP31A sind kältespezifische Edierungsfaktoren

Da die Effizienz der C→U-mRNA-Edierung von 13 der insgesamt 34 Edierungsstellen in Arabidopsis-Chloroplasten in *cp31a*-Mutanten reduziert ist (Tillich et al., 2009), wurden in dieser Arbeit *cp29a-knockout*-Linien auf ähnliche Defekte untersucht. Allerdings konnten hierbei keine nennenswerten Abweichungen der Edierungseffizienzen von denen in Col-0-Pflanzen identifiziert werden (Anhang 2, Abb.1). Um eine eventuelle kälteinduzierte Zunahme der Defekte in *cp29a x cp31a*-Doppelmutanten aufzudecken, wurden ausgewählte Edierungsstellen in *cp29a*- und *cp31a*- Einzel- und Doppelmutanten, sowie in Wildtyp-Pflanzen, die entweder für drei Wochen unter Standard-Bedingungen angezogen wurden, oder einem dreiwöchigen Kältestress ausgesetzt waren, sequenziert.

Zunächst zeigt der Vergleich der Edierung im Wildtyp bei 23 °C und 8 °C, dass Kältestress keinen generellen Effekt auf die mRNA-Edierung hat: In den meisten untersuchten Sequenzabschnitten ist die Edierungseffizienz durch die Applikation von Kältestress unbeeinflusst, in *rpoC1* ist sie dagegen leicht erhöht, und z.B. für *ndhB* (96698) leicht reduziert. Diese Daten ist konsistent mit vorherigen Publikationen: In Mitochondrien von Reis wurde ebenfalls beobachtet, dass einige Edierungsstellen durch 14-tägige Kältebehandlung (12 °C) beeinflusst werden, während andere unbeeinflusst bleiben (Kurihara-Yonemoto und Kubo, 2010). Selektive temperaturabhängige Inhibierung von Edierung konnte auch für einige *ndhB*-Edierungsstellen nach Hitzestress (37 °C - 42 °C; Karcher und Bock, 2002) beobachtet werden.

Auf Grund der Akkumulationsdefekte PEP-abhängiger Transkripte in *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten, wurden in die Edierungsanalyse alle Edierungsstellen von Genen, die für Untereinheiten der plastidär kodierten RNA-Polymerase (PEP) kodieren, einbezogen. Ein starker Edierungsdefekt in einem dieser Transkripte könnte die Aktivität der PEP beeinflussen und somit die beobachteten Transkriptreduktionen erklären. Im Fall der *rpoB* (25779)-Edierungsstelle ist weder in der Doppelmutante, noch nach Kältebehandlung der bereits von Tillich et al. (2009) beschriebene minimale Edierungsdefekt in *cp31a*-Mutanten verstärkt (Abb. 17). *rpoB* (25992) ist in allen getesteten Mutanten auch unter Kälte voll ediert. Ähnliche Ergebnisse wurden für alle Edierungsstellen innerhalb von *rpo*-Genen erzielt. Diese Ergebnisse belegen, dass der potentielle PEP-Defekt in *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten nicht auf reduzierte Edierungseffizienzen von *rpo*-Genen zurückzuführen ist. Die weiterhin untersuchten Edierungsstellen *rps14* (37161), *psbF* (63985) und *psbE* (64109) sind ebenfalls in allen untersuchten Genotypen unter normalen Temperaturbedingungen, sowie unter

Kältestress voll ediert. Dagegen ist der in *cp31a*-Mutanten beobachtete partielle *rps14* (37092)-Edierungsdefekt in der Doppelmutante, nicht jedoch nach Kältebehandlung verstärkt. Im Gegensatz dazu sind die Edierungsstellen *psbZ* (35800), *ndhB* (96698) und *ndhB* (97016) stark durch Kältestress beeinflusst: Sowohl in *cp31a*- als auch in *cp29a*-Mutanten treten an diesen Stellen bei 8 °C Edierungsdefekte auf, die jeweils in *cp29a* x *cp31a*-Doppelmutanten erhöht sind (Abb. 17). CP29A und CP31A sind also kältespezifische Edierungsfaktoren für mindestens drei Edierungsstellen.

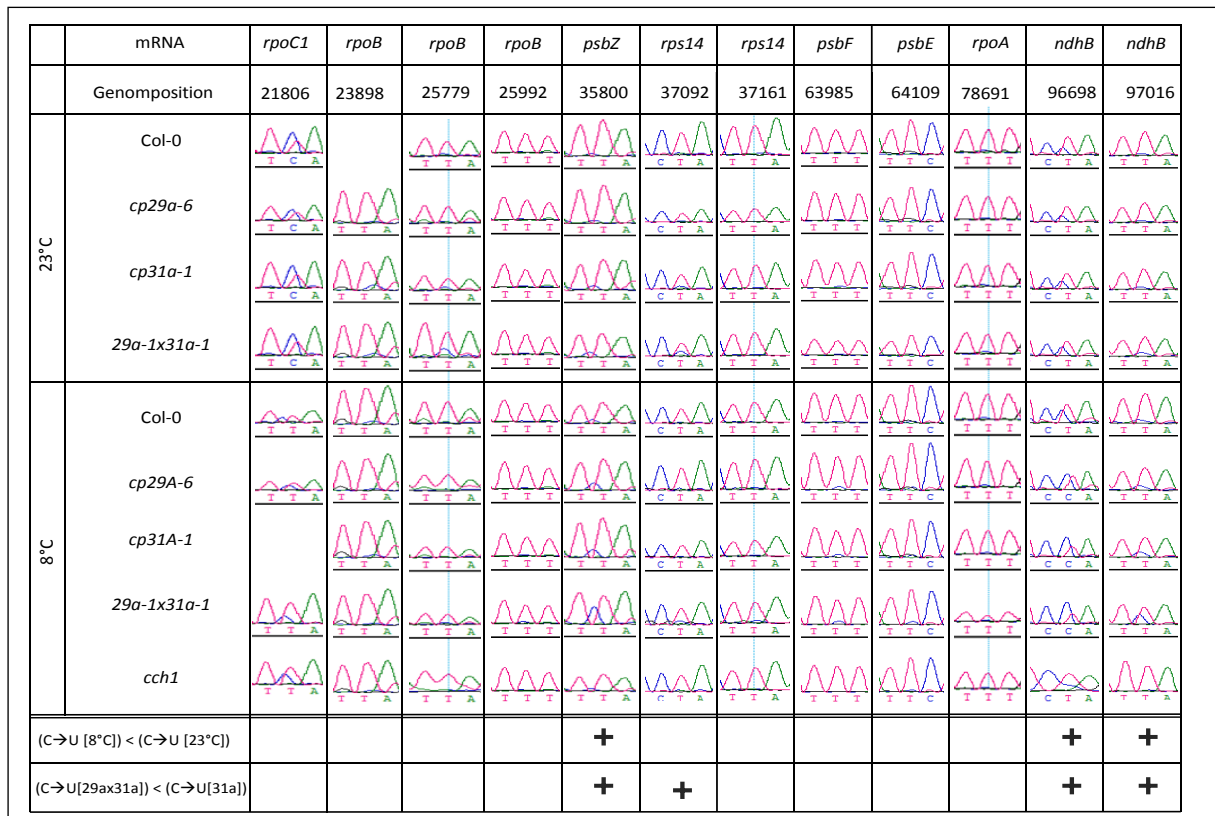


Abbildung 17 Analyse ausgewählter plastidärer C→U-Edierungsstellen mittels Sanger-Sequenzierung. Es wurden PCR-Produkte amplifiziert, welche die Edierungsstellen überspannen, und durch die Firma SMB (*Services in Molecular Biology GmbH*) sequenziert. Das Auftreten eines Cytosin-Signals an den entsprechenden RNA-Positionen spiegelt unvollständige Edierung wieder. Aus dem Verhältnis von C- zu T-Signal an einer Edierungsstelle kann die Stärke des Defekts abgeschätzt werden (Tillich et al., 2009). Die Edierungsstelle ist jeweils die mittlere der drei dargestellten Basen.

4 Diskussion

4.1 CP29A und CP31A sind mit ungewöhnlich vielen RNAs, vornehmlich mRNAs, assoziiert

Die transkriptomweite Identifikation von RNA-Liganden ist bisher nur für wenige RNA-Bindeproteinen durchgeführt worden. Bisher wurden hauptsächlich die RNA-Ziele von PPR-Proteine, welche hochspezifisch mit einem oder wenigen Transkripten interagieren, durch RIP-Chip-Analysen ermittelt (Beick et al., 2008; Schmitz-Linneweber et al., 2006; Schmitz-Linneweber et al., 2005). Während die Familie der PPR-Proteine sehr groß ist (>450 Vertreter in *A. thaliana*; Schmitz-Linneweber und Small, 2008), sind ihre Mitglieder wenig abundant (Robbins et al., 2009). Die cpRNP-Familie hat dagegen lediglich 10 Mitglieder, die allerdings zu den abundantesten Proteinen im Chloroplasten gehören (Nakamura et al., 2001). Diese Abundanz, sowie ihre Fähigkeit *in vitro* sequenzunspezifisch mit RNA und mit geringerer Affinität mit DNA zu interagieren (Li und Sugiura, 1991), führte zu der Annahme, dass cpRNPs auch *in vivo* unspezifische RNA-Bindeproteine darstellen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die cpRNPs CP29A und CP31A tatsächlich mit sehr vielen RNAs, vornehmlich mit mRNAs assoziiert sind, während tRNAs und rRNAs eine sehr geringe Anreicherung zeigen (Abb. 5). Diese Ergebnisse bestätigen und erweitern die von Nakamura et al. (1999 und 2001) beobachtete Präzipitation von Tabak-cpRNPs mit ausgewählten mRNAs gegenüber lediglich geringer Anreicherung der 23S-rRNA und tRNAs *in vivo*. Für diese Diskriminierung könnte eine bevorzugte Interaktion der cpRNPs mit einzelsträngigen RNA-Bereichen der mRNAs gegenüber doppelsträngigen Strukturen, die in tRNAs und rRNAs dominieren (Gauss und Sprinzl, 1983; Gutell, 1994; Rich und RajBhandar, 1976), verantwortlich sein.

Darüber hinaus konnten überraschende Spezifitäten der beiden Proteine für bestimmte mRNAs ausgemacht werden (Abb. 5; s. 4.2). CP29A und CP31A besitzen also die Fähigkeit mit einer größeren Zahl von RNAs spezifisch zu interagieren. Die Spezifität der RNA-cpRNP-Interaktion wird vermutlich durch Faktoren wie die Sekundärstruktur der RNA, die Oligomerisierung von cpRNPs (Nakamura et al., 2001), ihr Phosphorylierungsstatus (Lisitsky und Schuster, 1995; Loza-Tavera et al., 2006; Reiland et al., 2009; Kleffmann et al., 2006) oder ihre Interaktion mit weiteren Proteinen beeinflusst.

Die ebenfalls von Nakamura et al. (1999) beobachtete Diskriminierung einiger cpRNPs zwischen intronhaltigen und nicht intronhaltigen tRNAs konnte hier für CP31A bestätigt

werden. Die Werte der Anreicherung von tRNAs waren zwar insgesamt denen der meisten mRNAs untergeordnet, jedoch für intronhaltige Transkripte, wie *trnG* und *trnA* gegenüber intronlosen tRNAs wie *trnS* oder *trnT* deutlich erhöht (Anhang 1, Tab. 7). CP31A könnte Teil eines tRNA-Spleißkomplexes sein. Die insgesamt geringen Anreicherungsgrade können damit begründet werden, dass ausschließlich nicht-gespleißte Vorläufer, welche sehr viel weniger abundant als die gespleißten Transkripte sind (z.B. Nakamura et al., 1999), mit CP31A interagieren. Auf Grund des geringen Anteils intronhaltiger tRNA-Vorläufer gegenüber gespleißten tRNAs, sowie der begrenzten Auflösung des verwendeten *Microarrays* (mit PCR-Produkten mit einer durchschnittlichen Länge von 500 nt) war es in dieser Arbeit allerdings nicht möglich, zwischen der Interaktion von CP31A mit einer nicht-gespleißten tRNA gegenüber der Assoziation mit der gespleißten Form zu unterscheiden. Northern-Analysen der IP-RNAs mit Exon1-Exon2-spezifischen tRNA-Sonden könnten diesen Sachverhalt aufklären.

Das Arabidopsis-Protein CP29A besitzt hohe Sequenzähnlichkeit zu cp29A und cp29B aus Tabak (Ohta et al., 1995), welche in Immunpräzipitationen sowohl mit der *trnF*-tRNA, die kein Intron besitzt, sowie der intronhaltigen *trnL*(UAA)-tRNA keine Präzipitation zeigt (Nakamura et al., 1999). In dieser Arbeit konnten, konsistent mit diesen Beobachtungen, lediglich geringe Werte der Anreicherung für alle tRNAs, ohne Präferenzen von CP29A für tRNAs, die ein Intron tragen, identifiziert werden (Anhang 1, Tab. 7).

Überraschenderweise konnte in dieser Arbeit die von Nakamura et al. (1999 und 2001) beschriebene Assoziation von cpRNPs mit der *psbA*-mRNA nicht bestätigt werden. Vielmehr repräsentiert *psbA* eine der wenigen nur sehr schwach mit CP29A und CP31A kopräzipitierenden mRNAs. Möglicherweise interagieren in Arabidopsis nicht, wie in Tabak, Gruppe I- und II cpRNPs, zu denen CP31A und CP29A gehören, sondern Gruppe III cpRNPs (in Arabidopsis bestehend aus CP33B, CP33C und CP28B), die in Tabak lediglich eine geringe Assoziation mit der *psbA*-mRNA zeigen (Nakamura et al., 2001), mit diesem Transkript. Bisher unveröffentlichte RIP-Chip-Analysen von CP33B weisen auf eine starke Interaktion dieses Proteins mit der *psbA*-mRNA hin (persönliche Information von Marlene Teubner).

4.2 Die RNA-Interaktionsprofile von CP29A und CP31A zeigen hohe Ähnlichkeit

Interessanterweise gleichen sich die in RIP-Chip-Analysen ermittelten RNA-Interaktionen von CP29A und CP31A zu einem großen Teil. Für beide Proteine wurden die stärksten

Anreicherungs- und Bindungswerte für die PS I- und PS II-Untereinheiten kodierenden Transkripte *psaB-psaA*, *psbD* und *psbB*, ein Transkript der ATP-Synthase *atpB*, sowie die *ndhB*-mRNA, welche für eine Untereinheit des NDH-Komplexes kodiert, gefunden (Abb. 5A). Mittels RIP-Chip-Analysen ist es zwar möglich, die relativen Anreicherungen von RNA-Spezies gegenüber anderen RNA-Spezies darzustellen, eine quantitative Aussage über den Anteil einer RNA, die mit dem präzipitierten Protein interagiert, kann jedoch nicht getroffen werden. Deshalb wurden die Erkenntnisse aus den RIP-Chips durch *Dot-Blot*-Analysen um diese quantitative Aussage erweitert. Hier werden klare Unterschiede in der mRNA-Interaktion der zwei Proteine deutlich: So ist CP29A mit einem Großteil der *rbcL*-mRNA, jedoch lediglich mit einem geringen Anteil der anderen untersuchten mRNAs assoziiert (Abb. 5B), während die Affinitäten von CP31A für bestimmte mRNAs eher moderat variieren (z.B. stärkere Assoziation mit *atpH* oder *psaA* gegenüber *accD*, *rpl33*; Abb. 5B).

Analysen der RNA-Protein-Interaktionen innerhalb eines Transkripts mittels Oligonukleotid-RIP-Chip-Analysen ergaben wiederum ein ähnliches Bindungsverhalten für beide untersuchten Proteine. Sowohl für CP29A als auch für CP31A konnte eine bevorzugte Interaktion einzelsträngiger Exon-Regionen gegenüber hauptsächlich doppelsträngiger Intron-Strukturen (Michel und Dujon, 1983) innerhalb der *ndhB*-mRNA ermittelt werden. Hohe Ähnlichkeiten zeigen sich auch in der Interaktion beider Proteine mit dem gesamten tricistronischen *psaA/B-rps14*-Transkript (Abb. 6).

Die folgenden Analysen der Transkriptakkumulationen in *cp29a*- und *cp31a*- Einzel- und Doppelmutanten unter Standard- und Kältestress-Bedingungen lieferten allerdings keinen Beleg für die anhand dieser Bindungsanalysen zunächst vermuteten redundanten Funktionen der beiden cpRNPs: Die beobachteten Prozessierungs- und Akkumulationsdefekte sind vielmehr für das Fehlen eines der beiden Proteine charakteristisch (Abb. 14: *rpl33*, *ycf3* und *rpoC1*) oder addieren sich in der *cp29a* x *cp31a*- Doppelmutante (Abb. 13: *psaA*, *psbF*, *psbB*, *psbD*; Abb. 14: ungespleißtes *rps4-ycf3*-Transkript). CP29A und CP31A wirken also sowohl spezifisch als auch additiv auf die Prozessierung und die Stabilität gemeinsam gebundener mRNAs ein.

Deutliche Unterschiede sind in der Assoziation der zwei cpRNPs mit der *ndhF*-mRNA zu beobachten: CP31A interagiert mit einer Region, welche die *ndhF*-Edierungsstelle enthält, und mit der *ndhF*-3'-UTR, während CP29A nicht mit *ndhF* assoziiert ist. Im Falle des *ndhF*-Transkripts scheinen also die Orte der Interaktion die Funktion der Proteine zu definieren: CP31A, jedoch nicht CP29A ist in die Edierung der *ndhF*-mRNA (Tillich et al., 2009; Anhang 2, Abb. 1) involviert. Eine drastische Reduktion der *ndhF*-mRNA, die auf einer

Destabilisierung des reifen *ndhF*-3'-Endes beruht, konnte in *cp31a*-Mutanten identifiziert werden. Dieser Defekt ist in *cp29a*-Mutanten zwar ebenfalls detektierbar, allerdings weitaus weniger stark ausgeprägt (Abb. 7 und Abb. 13; Kupsch et al., 2012).

4.3 CP31A interagiert mit einem Großteil des plastidären mRNA-Pools, ist jedoch nicht (allein) verantwortlich für dessen Stabilisierung

Bereits in den RIP-Chip-Experimenten wurden für CP31A konstant höhere Anreicherungsquotienten als für CP29A ermittelt (Abb. 5A). Diese Beobachtung konnte durch quantitative *Dot-Blot*-Analysen bestätigt werden (Abb. 5B). Diese zeigen deutlich einen jeweils höheren Anteil der Transkripte in den Immunpräzipitaten gegenüber den zugehörigen IP-Überständen. Die höheren RNA-Mengen in CP31A-IPs im Vergleich zu CP29A-IPs korreliert jedoch nicht mit der Effizienz der Immunpräzipitation der beiden cpRNPs, die im Falle von CP31A geringer als für CP29A ist. Ähnliches wurde bereits zuvor für Tabak-cpRNPs beobachtet, welche die *psbA*-mRNA fast quantitativ präzipitieren (Nakamura et al., 2001). CP31A ist also mit einem Großteil der plastidären mRNAs assoziiert. Diese Beobachtung führte zu der Spekulation über eine Funktion von CP31A als Stabilisierungsfaktor eines nicht translatierten mRNA-Pools. In folgenden Analysen der Transkriptakkumulationen in *cp31a*-Mutanten wurden allerdings, neben der drastischen Reduktion von *ndhF*, lediglich geringe Änderungen der Transkriptmengen im Vergleich zum Wildtyp detektiert (Abb. 7; s. 4.4). Auch die *rbcL*-mRNA, die sowohl mit CP29A als auch mit CP31A stark assoziiert ist, akkumuliert in *cp29a*- und *cp31a*- Einzel- und Doppelmутanten normal. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine Funktion dieser cpRNPs als generelle RNA-Stabilisierungsfaktoren.

In Immun-Depletions-Experimenten, die von Nakamura und Mitarbeitern (2001) durchgeführt wurden, führte zwar das gleichzeitige Fehlen der Tabak- cpRNPs cp28, cp29A, cp29B, cp31 und cp33 zu einer verkürzten Halbwertszeit einer *in vitro* synthetisierten mRNA; der beobachtete Effekt war allerdings sehr gering.

Es ist nicht auszuschließen, dass multiple funktionelle Redundanzen innerhalb der cpRNP-Familie, die in Arabidopsis zehn Mitglieder hat, vorliegen, und das Ausschalten weiterer Mitglieder dieser Proteinfamilie eine allgemeine Verminderung der Transkriptstabilitäten *in vivo* zur Folge hätten. Für solche Redundanzeffekte gibt es aber bisher keine Hinweise.

4.4 CP31A ist unter Standard-Wachstumsbedingungen an der Stabilisierung weniger spezifischer Transkripte beteiligt

Die in dieser Arbeit durchgeführten qRT-PCR-Analysen zeigten neben einer drastischen Reduktion von *ndhF* und *ycfI* ebenfalls eine verminderte Abundanz der gespleißten *ndhB*-mRNA, sowie der Intron 1 gespleißten *ycf3*-mRNA (Abb. 8).

Die Reduktion der *ycfI*-mRNA konnte in weiteren Arbeiten nicht mittels Northern-Analysen bestätigt werden. Stattdessen wurde die Existenz einer *ycfI*-antisense-mRNA entdeckt, die in Teilen komplementär zu der *ycfI*-mRNA ist, dessen 3'-Bereich jedoch durch seine einzigartige Lage im Chloroplastengenom an der Grenze zwischen SSC (*small single copy region*) und IR (*inverted repeats*) identisch mit der *ndhF*-mRNA ist. *ycfI*-antisense und *ndhF*-Transkripte verfügen somit über identische Sequenzen im 3'-Bereich. Interessanterweise sind alle Transkripte, die dieses 3'-Ende besitzen in *cp31a*-Mutanten dramatisch reduziert. Dagegen akkumulieren *ycfI*-antisense-Transkripte mit einem verkürzten 3'-Ende in diesen Mutanten (Kupsch et al., 2012). Die hier durchgeführten Oligonukleotid-RIP-Chip-Analysen weisen auf eine bevorzugte Interaktion von CP31A mit der *ndhF*-3'-UTR hin (Abb. 6). Zusammen belegen diese Ergebnisse eine Funktion von CP31A in der Stabilisierung des *ndhF*-3'-Endes.

Ein ähnlicher Effekt konnte für *ndhB* beobachtet werden: Sowohl in qRT-PCR- als auch in Northern-Analysen war in *cp31a*-Mutanten eine Reduktion der reifen *ndhB*-mRNA zu beobachten, während in Northern-Analysen die verstärkte Akkumulation eines verkürzten Transkripts (0,7 kb, Abb. 14, links) detektiert werden konnte. Auch hier könnte also durch das Fehlen der Bindung von CP31A ein exo- oder endonukleolytischer Abbau der *ndhB*-mRNA induziert werden. Die Akkumulation verkürzter Transkripte kann durch die Hemmung des vollständigen Abbaus durch Sekundärstrukturen innerhalb eines Transkripts oder die Bindung weiterer RNA-Interaktionsfaktoren begründet werden.

Die gespleißte *ycf3*-mRNA ist ebenfalls selektiv reduziert, während ihr Intron 1-haltiger Vorläufer auf Wildtyp-Niveau akkumuliert.

4.5 CP29A und CP31A vermitteln Kältetoleranz in jungen Geweben

Während veränderte Lichtbedingungen nicht zu makroskopischen Defekten in den hier untersuchten Mutanten führten (Abb. 9), war ein deutliches Ausbleichen des unter Kältestressbedingungen (8 °C) gebildeten Blattgewebes zu beobachten (Abb. 10).

In der gemäßigten Klimazone ist Kälte ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$) ein entscheidender abiotischer Faktor, der sowohl auf die geographische Ausbreitung, als auch die Effizienz der Reproduktivität von Pflanzen, einschließlich der hier untersuchten Modellpflanze *A. thaliana*, limitierend wirken kann (Hoffmann, 2002; Ding et al., 2012). Niedrige Temperaturen ($0 - 12\text{ }^{\circ}\text{C}$) können in Pflanzenzellen eine verminderte Fluidität von Membranen, veränderte Faltung von Proteinen und Nukleinsäuren, sowie die verringerte Aktivität vieler Enzyme bewirken. Dies hat unter anderem eine reduzierte CO_2 -Fixierung auf Grund eines verlangsamten Calvin-Zyklus und die oxidative Schädigung des Photosystems I durch verminderte Aktivität der Superoxid-Dismutase zur Folge (Tijus et al., 1998).

Um den negativen Effekten niedriger Temperaturen entgegenzuwirken, finden massive Veränderungen der Genexpression statt. In Arabidopsis-Blättern, die sich bei $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ entwickeln, kommt es z.B. zu einer generellen Erhöhung der Protein-Biosynthese, wodurch die verminderte Aktivität vieler Enzyme kompensiert werden kann (Strand, 1999). Außerdem ist die Aktivität von Enzymen für die Saccharose-Biosynthese spezifisch erhöht (Strand, 1999); dies bewirkt eine Gefrierpunktserhöhung des Zytosols durch einen Anstieg der Konzentration gelöster Moleküle und führt somit zu einer nachfolgend erhöhten Frosttoleranz der Pflanze.

Bei einer Untersuchung verschiedener durch EMS (Ethylmethansulfonat)-Behandlung generierter kältesensitiver Arabidopsis-Mutanten konnten verschiedene makroskopische Phänotypen unterschieden werden (Tokuhisa et al., 1997): Mehr als ein Drittel aller Mutanten, die sich nach einer 10 - 42 Tage andauernden Kälteperiode ($5 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$) vom Wildtyp unterschieden, zeigten ein Ausbleichen der jungen, unter Kälte gebildeten Blätter und Sprossachsen, während ältere Gewebe ihr grüne Färbung behielten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Nullmutanten von CP29A und CP31A ebenfalls dieser Gruppe zuzuordnen sind. Die Analysen von Tokuhisa (1997) ergaben weiterhin bei ca. 10% der Pflanzen ein Ausbleichen der neu gebildeten, sowie der bereits vor dem Kältestress bestehenden Gewebe, außerdem verringertes Wachstum (bei ca. $\frac{1}{4}$ der untersuchten Mutanten), Nekrosen (bei ca. 10% der Mutanten) sowie vereinzelt hohe Anthocyan-Einlagerungen und das Absterben ganzer Pflanzen (Tokuhisa et al., 1997). Kreuzungen verschiedener Mutanten, welche eine Chlorose der unter Kälte entstandenen Blätter zeigten, ergaben F1-Generationen mit Wildtyp-Phänotyp. Diese Ergebnisse belegen, dass vielfältige Faktoren die Kältetoleranz von Arabidopsis vermitteln und deren Fehlen diverse Mechanismen in der Pflanzenentwicklung und der Aufrechterhaltung von Zellfunktionen negativ beeinflussen. Außerdem zeigen diese Analysen, dass der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Phänotyp von *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten durch den Verlust verschiedener,

nicht allelischer Proteine hervorgerufen werden kann. Einige dieser Faktoren sind bereits näher untersucht und sind häufig mit der plastidären Translation, bzw. der Reifung ribosomaler RNAs verknüpft. So ist z.B. die Ribosomenakkumulation unter Kältestress in der Mais-Mutante *M11* (Miller et al., 1969), und in der *v16*-Mutante (Hopkins und Elfman, 1984) in Gerste reduziert. In *Arabidopsis* verursacht z.B. der Verlust einer *rrn16*-Dimethylase (DIM1) ein sehr ähnliches Ausbleichen junger Gewebe nach Kältestress, zeigt jedoch Wildtyp-Phänotyp unter normalen Temperaturbedingungen (Tokuhisa et al., 1998). Kältesensitives Ausbleichen wurde in *Arabidopsis* außerdem für Null-Mutanten eines Elongationsfaktors der plastidären Translation (SVR3; Liu et al., 2010a), sowie eines RNA-bindenden Proteins, welches mit einem Vorläufer der 16S-rRNA sowie der *clpP*-mRNA interagiert (NUS1; Kusumi et al., 2011), beobachtet. Unter Kälte wurde außerdem ein Pausieren von Ribosomen auf der *psbA*-mRNA beobachtet (Grennan und Ort, 2007). Es können jedoch auch Mutationen, welche die Akkumulation spezifischer Untereinheiten der Photosynthese-Komplexe I und II hemmen, zu dem hier beobachteten kältesensitiven Phänotyp führen. Beispiele dafür sind die *var2*-Mutante, in der eine für den Abbau von oxidativ geschädigten D1-Proteinen verantwortliche ATP-abhängige Metalloprotease ausgeschaltet ist (Liu et al., 2010b), sowie eine artifizielle *ycf3*-Spleißmutante (Petersen et al., 2011).

Die möglichen molekularen Grundlagen für das Auftreten des chlorotischen Phänotyps in *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten sind im Gegensatz zu den genannten Beispielen vielfältig und werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

4.6 Kältestress führt zu rRNA-Prozessierungsdefekten in *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten

Im Gegensatz zu den oben genannten Publikationen umfassen die in dieser Arbeit erhobenen Daten nicht nur die Identifikation der cpRNPs CP29A und CP31A als Faktoren, die Kältetoleranz in *Arabidopsis* vermitteln, sondern ebenso die *in vivo* bestehenden RNA-Interaktions-Profile dieser Proteine. Dies ermöglicht eine Unterscheidung der in Null-Mutanten auftretenden primären und sekundären Defekte: So ist z.B. eine direkte Beeinflussung der rRNA-Prozessierung durch CP29A und CP31A, aufgrund fehlender Interaktion mit diesen Molekülen, als primäre Ursache für die mutanten Phänotypen unwahrscheinlich. Dennoch wurden in den untersuchten Mutanten Defekte innerhalb der 3'-Prozessierung der 16S-rRNA, und der Abspaltung eines 1,1 kb großen Bruchstücks der 23S-rRNA detektiert (Abb. 15). Da die Schnitte innerhalb der 23S-rRNA, die unter Kälte in

cp29a- und *cp31a*-Mutanten reduziert sind, erst während der Ribosomenassemblierung erfolgen (Nishimura et al., 2010; Prikryl et al., 2008), können diverse ribosomale Defekte die fehlerhafte rRNA-Prozessierung verursachen. So konnte in *ppr4*-Mutanten, in denen das Transsplicing des *rps12*-Introns gestört ist, eine ähnliche Überakkumulation von 23S-Vorläufermolekülen bei gleichzeitiger Reduktion der prozessierten Formen beobachtet werden, obwohl RIP-Chip-Analysen die Abwesenheit einer Interaktion von PPR4 mit rRNAs belegen (Schmitz-Linneweber et al., 2006). Auch die weiter oben beschriebenen kältesensitiven Mutanten *var2* und *svr3* zeigen ähnliche 23S- und 16S-Prozessierungsdefekte, obwohl ihre Funktionen im Proteinabbau, bzw. der Translationselongation liegen. Dies belegt, dass rRNA-Prozessierungsdefekte eine sekundäre Folge einer gestörten plastidären Translation sein können. Die primäre Ursache für die in *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten beobachteten Defekte könnten z.B. in der fehlerhaften Prozessierung, bzw. der verminderten Akkumulation von Genen, die für Proteinkomponenten der Ribosomen kodieren, liegen (*rpl33*, Abb. 14; *rsp16*, Anhang 2, Abb. 2).

4.7 CP29A und CP31A sind unter Kältestress an multiplen mRNA-Reifungsprozessen beteiligt

Die Analyse der Proteinakkumulation in den kältegestressten, chlorotischen Geweben von *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten ergab eine mehr als 50%ige Reduktion aller untersuchten Photosynthesekomplex-Untereinheiten (Abb. 12). Northern-Analysen belegen, dass die zugehörigen Transkriptmengen ebenfalls reduziert sind (Abb. 13). Bei der Analyse der RNA-Akkumulationen fiel auf, dass RNAs, deren Transkription von der plastidär kodierten RNA-Polymerase (PEP) abhängig ist, stark reduziert sind (Abb. 13, *psaA*, *psbD*, *psbF*, *psbB*, *rbcL*, *petB*), während Transkripte mit NEP-Promotoren auf Wildtyp-Niveau oder stärker akkumulieren (Abb. 14: *ycf3*, *rps4*, *rpl33*, *rpoC1*; Anhang 2, Abb. 2: *accD*, *clpP*). Es liegt also eine gezielte Degradation der untersuchten PEP-Transkripte in Folge einer fehlenden Stabilisierung durch die Interaktion mit cpRNPs, oder eine direkte oder indirekte Beeinflussung der Funktionsfähigkeit der PEP in den untersuchten chlorotischen Geweben vor.

Einen Hinweis auf eine mögliche Dysfunktion der PEP in *cp29a*-Mutanten liefert eine Untersuchung des *rpoC1*-Spleißens mittels Northern-Analysen (Abb. 14). Bereits unter Standard-Wachstumsbedingungen ist das Spleißen des *rpoC1*-Introns in CP29A defizitären Mutanten um ca. 20% im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen reduziert (Abb. 14C). Unter Kälte

ist dieser Defekt leicht verstärkt. *Run-on*-Analysen belegen zwar eine uneingeschränkte Funktionsfähigkeit der PEP unter Standard-Bedingungen in *cp29a*-Mutanten (Abb. 16B), dennoch kann eine Beeinträchtigung ihrer Funktion unter Kältestress nicht ausgeschlossen werden. Unter Kältestress ist in *cp31a*-Mutanten das Spleißen des *rpoC1*-Introns ebenfalls reduziert. Die deutlichere Ausprägung dieses Spleißdefekts in *cp29a*-Mutanten (ca. 25%), als in *cp31a*-Mutanten (nur ca. 5%) könnte die stärkere Reduktion PEP-abhängiger Transkripte in diesen Mutanten unter Kältestress erklären (Abb. 13, Abb. 14C).

Interessanterweise sind die ebenfalls PEP-abhängigen *rrn23*- und *rrn16*-Transkripte, welche in RIP-Chip- und *Dot-Blot*-Analysen keine Interaktion mit CP29A und CP31A zeigen, in den untersuchten Mutanten zwar falsch prozessiert, aber in ihrer Gesamtheit nicht gegenüber dem Wildtyp reduziert. In Arabidopsis-Pflanzen wird das *rrn*-Operon hauptsächlich von einem PEP-abhängigen P2-Promotor abgelesen. Zwar existiert ebenfalls ein NEP-Promotor, dieser spielt aber bereits zwei Tage nach der Samenkeimung eine untergeordnete Rolle, wie Primerextension-Analysen (Chi et al., 2010; Courtois et al., 2007) belegen. Ein genereller PEP-Defekt sollte zu einer vergleichbaren Reduktion aller von dieser Polymerase abhängigen Transkripte, also auch *rrn16* und *rrn23* führen. Allerdings ist unklar in wie fern sich die Promotornutzung in dem hier untersuchten chlorotischen Gewebe von dem in jungen, grünen Keimlingen unterscheidet. In vollständig weißen Spectinomycin-behandelten Col-0-Keimlingen erfolgt die Transkription von *rrn16* z.B. ausschließlich ausgehend vom NEP-Promotor und führt zu einer mit photosynthetisch aktiven Keimlingen vergleichbaren Akkumulation des Transkripts (Swiatecka-Hagenbruch et al., 2007). Insgesamt erscheint auf Grund der Reduktion der meisten PEP-abhängigen Gene in *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten die Hypothese einer reduzierten PEP-Aktivität durch eine Beeinträchtigung des *rpoC1*-Spleißen, oder durch Defekte der Expression hier nicht untersuchter *rpo*-Gene plausibel.

In den Nullmutanten der beiden cpRNPs ist außerdem die Prozessierung der *ycf3*-mRNA gestört. In *cp29a*-Mutanten ist die gespleißte *ycf3*-mRNA reduziert, bei gleichzeitiger Überakkumulation einiger nicht gespleißter Vorläufer-Transkripte (Abb. 14A und B). Es sind allerdings selektiv Transkripte überrepräsentiert, die noch beide *ycf3*-Introns enthalten, während solche, die nur noch Intron 1 tragen, auf Wildtyp-Niveau akkumulieren. Eine hypothetische Funktion von CP29A könnte also darin bestehen unter Kältestress solche Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen zu stabilisieren, die ein (simultanes) Herausschneiden beider Introns ermöglichen. Da die *ycf3*-mRNA für einen Interaktionsfaktor der Photosystem I-Untereinheiten PsaA und PsaD kodiert, führt die Reduktion des reifen *ycf3*-Transkripts zu einer verminderten Akkumulation von PS I (Ruf et al., 1997). Im Gegensatz zu Starklicht-

Stressbedingungen, die hauptsächlich eine Schädigung von PS II hervorrufen, führt Kältestress darüber hinaus durch die spezifische Hemmung der Superoxid-Dismutase-Aktivität zu einer irreversiblen Schädigung von PS I (Zhang und Scheller, 2004 sowie Referenzen darin). Durch die zusätzliche Reduktion der PS I-Akkumulation in Abwesenheit von CP29A wird der Anteil des funktionalen PS I weiter reduziert und dies kann ein Ausbleichen der geschädigten Gewebe in *cp29a*-Mutanten begünstigen (siehe auch Petersen et al., 2011).

In *cp31a*-Mutanten ist ebenfalls die Prozessierung der *ycf3*-mRNA betroffen, allerdings unterscheidet sich das unter Kälte beobachtete Transkriptmuster deutlich von dem in *cp29a*-Mutanten (Abb. 14A und B). Alle Vorläufer überakkumulieren, während die Menge der reifen *ycf3*-mRNA das Wildtyp-Niveau erreicht. Die Abundanz eines dicistronischen *rps14-ycf3*-Transkripts, welches das *ycf3*-Intron 1, jedoch nicht Intron 2 enthält (Transkript II; Abb. 14B) ist allerdings in *cp31a*-Mutanten besonders deutlich gegenüber dem Wildtyp erhöht. Die Funktion von CP31A könnte darin bestehen am Abbau von Transkripten, die unter Kältestress nicht gespleißt werden können, z.B. als Teil eines plastidären Degradasoms, mitzuwirken.

Bei der Interpretation dieser Resultate ist allerdings zu berücksichtigen, dass ein PEP-Defekt oft mit einer Überakkumulation von NEP-abhängig transkribierten Genen, zu denen auch *ycf3* gehört (Cho et al., 2009; Nagashima et al., 2004), einher geht (z.B. Chi et al., 2010; Hajdukiewicz et al., 1997). CP31A könnte also unter Kälte direkt in den Spleißprozess des *ycf3*-Intron 1 involviert sein und sein Fehlen in *cp31a*-Mutanten zu einer Reduktion der gespleißten *ycf3*-mRNA gegenüber Intron 1 haltigen Vorläufer führen. Durch die erhöhte Abundanz aller *ycf3*-Transkripte akkumuliert die reife *ycf3*-mRNA dennoch auf Wildtyp-Niveau. Petersen et al. (2011) stellen die Hypothese auf, dass in Abwesenheit von Intron 1 auf Grund fehlender Sekundärstrukturen das Herausschneiden von Intron 2 nicht mehr erfolgen kann. Eventuell ist auch das Spleißen des Intron 1 von der Existenz bestimmter Sekundärstrukturen abhängig, die in *cp31a*-Mutanten unter Kältestress nicht, bzw. anders gebildet werden. Dadurch würden Transkripte akkumulieren, die nicht gespleißt werden können.

In Northern-Analysen wurden außerdem große (vermutlich polycistronische) Transkripte detektiert, die den untersuchten Mutanten stark überakkumulieren, während die prozessierten Transkripte nicht beeinflusst sind. In *cp31a*-Mutanten sind davon zwei 6,2 kb und 5,8 kb große *ndhB*-Transkripte (Abb. 14), sowie ein ca. 6 kb großes *rps16*-Transkript (Anhang 2, Abb. 2B) betroffen. In *cp29a*-Mutanten überakkumuliert ein *accD*-Transkript (> 6 kb; Anhang 2, Abb. 2A), sowie ein *rps16*-Vorläufer (ca. 6 kb; Anhang 2, Abb. 2B). Diese

Defekte können, analog zu *ycf3*, durch ineffektive Degradation nicht prozessierter Transkripte oder die direkte Beeinflussung ihrer Prozessierung in *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten verursacht werden.

Neben der erwähnten Überakkumulation zweier ca. 6,2 kb und 5,8 kb großen Transkripte im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen, sind weitere Prozessierungsschritte der *ndhB*-mRNA in *cp31a*-Mutanten gestört: Während das monocistronische, intronhaltige *ndhB*-Transkript auf Wildtyp-Niveau akkumuliert, ist die gespleißte Form stark reduziert. Außerdem ist die Effizienz der C→U-Edierung zweier untersuchter Edierungsstellen innerhalb der *ndhB*-mRNA stark reduziert. CP31A scheint also unter Kältestress an multiplen Prozessierungsschritten von *ndhB*-Transkripten beteiligt zu sein, welche die Stabilisierung der reifen mRNA und/oder das Spleißen von Introns, die Prozessierung und/oder den Abbau polycistronischer Vorläufertranskripte, sowie die C→U-Edierung umfassen.

In *cp29a*-Mutanten konnten ähnliche *ndhB*-Prozessierungsdefekte beobachtet werden: Neben der Reduktion aller *ndhB*-Transkripte, die allerdings auch in der Kontroll-Mutante *cchl* auftritt, ist die gespleißte mRNA spezifisch reduziert. Auf Grund der insgesamt verminderten Akkumulation *ndhB*-haltiger Transkripte kann nicht entschieden werden, ob ein echter Spleißdefekt oder eine Destabilisierung der gespleißten *ndhB*-mRNA vorliegt (Abb. 14). Die Abwesenheit von CP29A führt unter Kältestress außerdem zu einer reduzierten C→U-Edierung der *ndhB*-, sowie der *psbZ*-mRNA (Abb. 17). Unter normalen Temperaturbedingungen sind dagegen keine Edierungsdefekte in *cp29a*-Mutanten gefunden worden (Anhang 2, Abb. 1). CP29A besitzt also eine Funktion als kältespezifischer Edierungsfaktor.

In *cp31a*-Mutanten wurde darüber hinaus eine reduzierte Akkumulation der *rpl33*-mRNA detektiert. Während ein 1,2 kb großes Transkript, welches eine tricistronische mRNA bestehend aus *psaJ*, *rpl33* und *rps18* repräsentieren könnte, eine erhöhte Abundanz gegenüber dem Wildtyp zeigt, ist das dicistronische *rpl33-rps18*-Transkript (0,7 kb) stark reduziert. Hier liegt die Funktion von CP31A möglicherweise in der Bereitstellung einer für den endo- oder exonukleolytischen Schnitt zwischen *psaJ* und *rpl33-rps18* günstigen Sekundärstruktur oder der Rekrutierung einer Nuklease. Da Rpl33 unter Kältestress für den Aufbau funktioneller Ribosomen essentiell ist (Rogalski et al., 2008), könnte ein Prozessierungsdefekt der zugehörigen Transkripte zu ineffizienter Translation führen und damit sekundär die unter Kälte beobachteten rRNA-Prozessierungsdefekte in *cp31a*-Mutanten verursachen. Rpl33 spielt im Ribosom eine Rolle bei dem Entlassen deacetylierter tRNAs aus dem Translationskomplex. Ein Fehlen des Proteins könnte also zu einer verlangsamten

Translationselongation führen. Rps18 ist bereits unter normalen Wachstumsbedingungen essentiell (Rogalski, 2006).

Eine mögliche primäre Ursache für analoge rRNA-Prozessierungsdefekte in *cp29a*-Mutanten, könnte die verminderte Akkumulation aller detektierbaren *rps16*-Transkripten, mit Ausnahme eines ca. 6 kb großen Vorläufers, der im Vergleich zum Wildtyp überakkumuliert (Anhang 2, Abb. 2B), sein. Es ist denkbar, dass ähnliche Defekte innerhalb der Prozessierung und Akkumulation weiterer hier nicht untersuchter *rps*- und *rpl*-Gene in *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten vorliegen. Die in *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten analog reduzierten Proteinmengen gegenüber den deutlich höheren Transkript-Akkumulationen in *cp31a*-Mutanten im Vergleich zu *cp29a*-Mutanten, weisen auf eine stärkere Beeinträchtigung der plastidären Translation in *cp31a*-Mutanten hin.

4.8 cpRNPs sind plastidäre Analoga der nukleären hnRNPs

Der Begriff hnRNPs bezeichnet eine Gruppe von ca. 20 Proteinen, die verschiedenartige RNA-Bindedomänen (eine oder mehrere RRM-, KH (K-Homologie)- und/oder SR (Serin/Arginin-reiche)- Domänen) besitzen und zu den abundantesten Proteinen im Zellkern von Metazoen gehören. Sie sind durch ihre Bindung an naszierende Polymerase II-Transkripte zum Teil Chromatin-assoziiert. Untersuchungen löslicher Extrakte zeigten darüber hinaus die Interaktion von hnRNPs mit mRNAs, während ihrer Prozessierung und ihrem Export aus dem Zellkern.

Phylogenetische Analysen belegen einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung von cpRNPs und solchen hnRNPs, die zwei RRM-Domänen und eine Carboxyl-terminale Glyzin-reiche Domäne besitzen (Maruyama, 1999).

Die Eigenschaften der beiden Proteinfamilien weisen offensichtliche Parallelen auf: Vertreter beider Proteinfamilien gehören jeweils zu den abundantesten Proteinen im Zellkern (hnRNPs), bzw. im Chloroplasten (cpRNPs). Obwohl hnRNPs und cpRNPs prinzipiell in der Lage sind mit RNA und DNA jeglicher Sequenz zu interagieren, bestehen klare sequenzspezifische Präferenzen: Bindestudien einiger hnRNPs lassen eine bevorzugte Interaktion des hnRNP A1 mit Poly(G)-Homoribonukleotiden erkennen; A2 ist dagegen bevorzugt mit Poly(U)-Oligonukleotiden, C1 und C2 sind exklusiv mit Poly(U)-Oligonukleotiden assoziiert. Für hnRNP A1 konnte außerdem die bevorzugte Interaktion mit 3'-Bereichen von Spleißstellen gegenüber Zufallssequenzen identifiziert werden. Für verschiedene Tabak-cpRNPs konnten Präferenzen für bestimmte Homoribonukleotide *in vitro*

identifiziert werden: cp28, cp31 und cp33 besitzen hohe Affinitäten zu Poly(G)- und Poly(U)-Oligonukleotiden, während sie lediglich schwach mit Poly(C)- und nicht mit Poly(A) assoziiert sind (Li und Sugiura, 1991). Für das Arabidopsis cpRNP CP31A konnte außerdem ein potentiell degeneriertes Bindemotiv (G/T T (C/T) G C/G T) identifiziert werden (Tillich et al., 2009).

Eine weitere Gemeinsamkeit besteht in der Diversität der Funktionen einzelner Mitglieder der cpRNP- und der hnRNP-Proteinfamilien. Das humane AUF1/hnRNP-D Protein ist Teil eines Stabilisierungskomplexes der α -globin-mRNA und interagiert dabei nachweislich direkt mit der RNA sowie weiteren Proteinfaktoren. Dieses Protein kann jedoch auch gegenteilig wirken: Es verursacht den rapiden Abbau der c-myc-RNA (Kiledjian et al., 1997). Da AUF1/hnRNP-D, wie viele hnRNPs ein Phosphoprotein ist, kann seine gegenteilige Wirkung auf verschiedene mRNAs durch Phosphorylierungen, welche die Affinität zu RNA und Proteinen beeinflussen, begründet werden (Kiledjian et al., 1997; Zhang 1993). Das humane hnRNP A1 ist konzentrationsabhängig involviert in das alternative Spleißen von mRNAs durch die Beeinflussung der Selektion einer von zwei möglichen Spleißstellen (Yang et al., 1994; Maymeda et al., 1994). Eine weitere Funktion von hnRNP A1 liegt in der Regulation des Exports von mRNA aus dem Zellkern.

Die in dieser Arbeit analysierten cpRNPs sind ebenfalls in multiple mRNA-Reifungsprozesse involviert: CP31A ist an der Stabilisierung einiger Transkripte, der C \rightarrow U-Edierung von 16 Edierungsstellen (Tillich et al., 2009), sowie Kältestress-spezifisch an der Prozessierung eines polycistronischen *rpl33*-Vorläufers beteiligt. CP29A ist bei niedrigen Temperaturen in Spleißprozesse (*rpoC1*, *ycf3*) und die Edierung der *psbZ*-, sowie zweier untersuchter *ndhB*-Edierungsstellen involviert.

Desweiteren werden die Mitglieder beider Proteinfamilien posttranslational modifiziert, was die Diversität ihrer Funktionen erklären könnte. Für hnRNPs ist die Phosphorylierung von Serinen und Threoninen und die Methylierung von Argininen beschrieben (Dreyfuss et al., 1993). CP31A, CP29A, CP29B und CP33B enthalten ebenfalls phosphorylierte Serine. Für die cpRNPs CP29A und CP29B existieren N-terminal acetylierte Isoformen. Für CP29B konnte darüber hinaus eine am N-Terminus um fünf Aminosäuren verkürzte Form detektiert werden (Wang et al., 2006). N-acetylierte und phosphorylierte Isoformen der cpRNPs werden lichtabhängig induziert (Wang et al., 2006; Kleffmann et al., 2006).

CpRNPs sind also in ihrer Abundanz, ihrer Regulation durch posttranslationale Modifikationen, und vor allem in der Erfüllung vielfältiger Funktionen innerhalb des mRNA-Metabolismus durch die Interaktion mit multiplen mRNAs mit den nukleo-zytoplasmatischen

hnRNPs zu vergleichen. CpRNPs tragen, wie viele andere kernkodierte RNA-Bindeproteine zur Eukaryotisierung der plastidären posttranskriptionalen mRNA-Prozessierung bei (s. Einleitung: 1.3). Die Vielzahl ihrer Ziel-RNAs und die Vielzahl der (unter Kältestress) beobachteten RNA-Prozessierungsdefekte in den hier untersuchten Null-Mutanten unterscheiden sie jedoch klar von anderen bekannten plastidär lokalisierten RNA-Bindeproteinen und weisen auf eine zentrale Rolle der cpRNPs in der Regulation des Zusammenspiels eukaryotischer Prozessierungsschritte (Intron-Spleißen, mRNA-Edierung, RNA-Endprozessierung), hin. Analog zu hnRNPs, die sogenannte posttranskriptionale Operons im Nukleus definieren, könnten cpRNPs diese Funktion in den Chloroplasten ausüben.

4.9 Modell für die Funktionsweise der cpRNPs

Die cpRNPs CP29A und CP31A beeinflussen die Akkumulation sowie die Prozessierung bestimmter RNAs unter Kältestress. Da cpRNPs keine enzymatischen Domänen besitzen, ist es wahrscheinlich, dass sie die RNA-Bindung weiterer RNA-bindender Proteine mit prozessiver Aktivität mit mRNA vermitteln bzw. erleichtern (z.B. Edierungs- und Spleißfaktoren), oder inhibieren (z.B. Endo- und Exonukleasen). Da die Interaktion der RRM-Domänen mit RNA-Molekülen durch die plane Oberfläche der β -Faltblätter erfolgt, ist die Nukleinsäure auch während der Assoziation mit cpRNPs exponiert (Dreyfuss et al., 1993); somit ist die Bindung weiterer Proteinfaktoren an den identischen Sequenzbereich möglich. Es ist also wahrscheinlich, dass cpRNPs die Bindung weiterer Proteinfaktoren eher unterstützen als hemmen. Die beobachtete Stabilisierung einiger mRNAs (z.B. *ndhF*) könnte nach diesem Modell durch die Rekrutierung von Spezifikationsfaktoren (z.B. PPR-Proteine) erfolgen, die wiederum die Inhibierung von Nukleasen bewirken können. Innerhalb der *ndhF*-mRNA konnten distinkte Regionen der Interaktion von CP31A, im Bereich der *ndhF*-Edierungsstelle und des reifen 3'-Endes, identifiziert werden (Abb. 6). In diesem Fall ist eine Funktion von CP31A in der Rekrutierung eines Edierungsfaktors, bzw. eines 3'-Stabilisierungsfaktors, durch eine direkte Interaktion der sauren Domäne und/oder der RRM-Domänen von CP31A mit diesen Faktoren wahrscheinlich. Dagegen konnten im Fall der *ndhB*- und der *psaA/psaB*-mRNA keine solche definierten Bindestellen identifiziert werden. Deshalb ist hier das Hinleiten eines spezifischen RNA-Prozessierungsfaktors zu einem definierten Bindemotiv durch die Protein-Protein-Interaktion mit CP31A oder CP29A schwer vorstellbar. Stattdessen könnte die Interaktion von cpRNPs mit der gesamten Länge eines

Transkripts einzelsträngige Strukturen stabilisieren, bzw. die potentielle Auffaltung der RNA in Sekundärstrukturen verhindern und damit die Bindung von RNA-Prozessierungsfaktoren erleichtern.

RNA-Moleküle können tatsächlich spontan Fehlfaltungen durch (alternative) Basenpaarungen ausbilden, die oft eine ähnliche Stabilität wie die native Konformation der RNA besitzen (Clodi et al., 1999; Waldsich et al., 2002). Solche inaktiven (nicht translatierbaren) RNA-Strukturen sind temperaturabhängig und können nur unter erhöhtem Energieaufwand wieder aufgelöst werden (Russel, 2008). Solche sogenannten kinetischen Fallen können durch RNA-Chaperone, welche durch ihre Bindung die aktive Form der RNA energetisch begünstigen, überwunden werden (Schröder, 2002). Es sind bereits einige Proteine, die eine solche kaltespezifische Chaperon-Funktion ausüben, identifiziert worden (z.B. CspA in *E. coli*, Jiang et al., 1997, oder GRP7, ein im Nukleus lokalisiertes Glyzin-reiches RNA-Bindeprotein in *A. thaliana*, Kim et al. 2007; Kim et al., 2008). Die Funktion von CP29A und CP31A könnte in der Aufrechterhaltung einzelsträngiger Bereiche (also der Verhinderung von Fehlfaltungen) unter Kältestress liegen (Abb. 18). In *cp29a*- und *cp31a*-Mutanten, dagegen, können einige Transkripte bei niedrigen Temperaturen solche Sekundärstrukturen ausbilden, welche die Zugänglichkeit von RNA-Bindemotiven z.B. für PPR-Proteine negativ beeinflussen können.

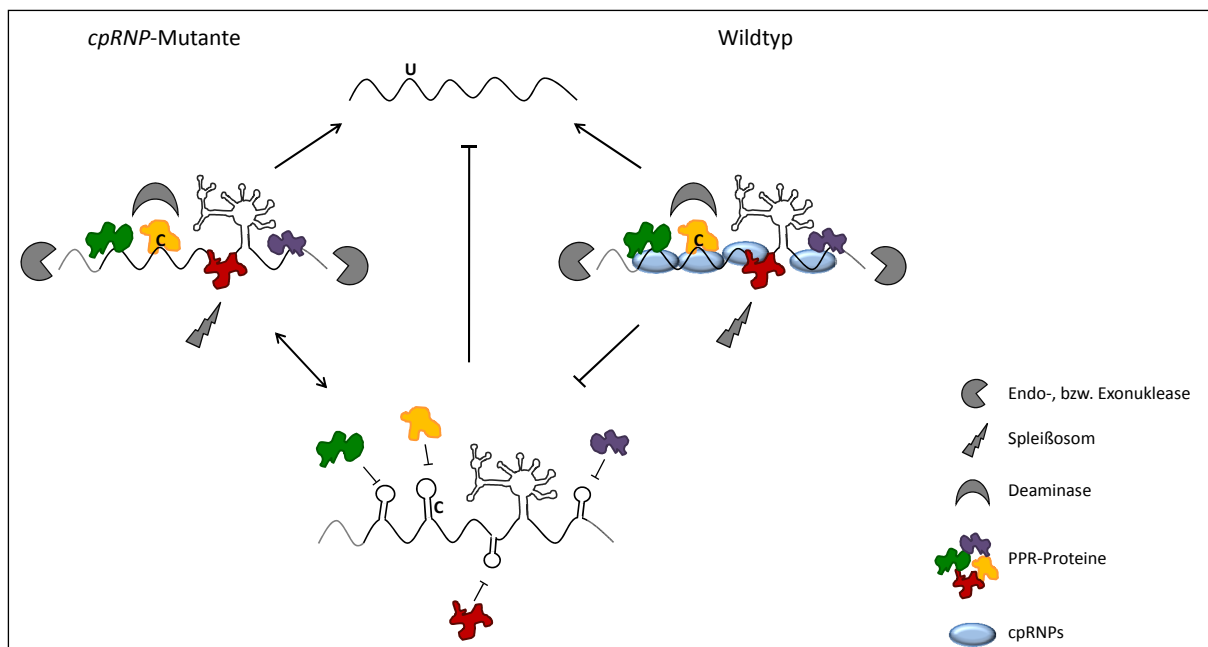


Abbildung 18 Modell der Funktionsweise von cpRNPs als RNA-Chaperone unter Kältestress. Durch die Interaktion von cpRNPs mit einzelsträngigen Bereichen plastidärer mRNAs, unterbinden sie die Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen (hier schematisch durch Stamm-Schleifen dargestellt). In cpRNP-Mutanten können solche Fehlfaltungen dagegen stattfinden und die Bindung spezifischer RNA-Prozessierungsfaktoren (z.B. Spleiß- und Edierungs-PPRs) erschweren.

Dies würde erklären warum die hier untersuchten Mutanten unter Standardbedingungen phänotypisch unauffällig waren. Da unter Kältestress die Prozessierung einiger, nicht jedoch aller mRNAs in den untersuchten Mutanten beeinflusst ist, wird vermutet, dass weitere Mitglieder der cpRNP-Familie für die Prozessierung zusätzlicher Transkripte verantwortlich sind, oder redundant zu CP29A und/oder CP31A auf diese einwirken.

Um die Zusammenwirkung der zehn Mitglieder der cpRNP-Familie in Arabidopsis besser zu verstehen, sollten zukünftig weitere cpRNP Nullmutanten, einschließlich Mehrfach-Mutanten, in denen möglichst viele cpRNPs gleichzeitig ausgeschaltet sind, auf ihre Transkriptmuster und -akkumulationen unter Standard- und Kältestressbedingungen untersucht werden.

Literaturverzeichnis

Allison, L. A., Simon, L. D. and Maliga, P. (1996). Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *The EMBO Journal* **15**, 2802-9.

Asakura, Y. und Barkan, A. (2006). *Arabidopsis* orthologs of maize chloroplast splicing factors promote splicing of orthologous and species-specific group II introns. *Plant Physiol* **142**, 1656-1663.

Asakura, Y. und Barkan, A. (2007). A CRM domain protein functions dually in group I and group II intron splicing in land plant chloroplasts. *Plant Cell* **19**, 3864-3875.

Baginsky, S. und Gruissem, W. (2009). The chloroplast kinase network: new insights from large-scale phosphoproteome profiling. *Mol Plant* **2**, 1141-1153.

Barkan, A. (1988). Proteins encoded by a complex chloroplast transcription unit are each translated from both monocistronic and polycistronic mRNAs. *The EMBO Journal* **7**, 2637-2644.

Barkan, A. und Goldschmidt-Clermont, M. (2000). Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie* **82**, 559-572.

Barkan, A., Klipcan, L., Ostersetzer, O., Kawamura, T., Asakura, Y. und Watkins, K. P. (2007). The CRM domain: an RNA binding module derived from an ancient ribosome-associated protein. *RNA* **13**, 55-64.

Barkan, A., Walker, M., Nolasco, M. and Johnson, D. (1994). A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. *The EMBO Journal* **13**, 3170-3181.

Baumgartner, B. J., Rapp, J. C. und Mullet, J. E. (1993). Plastid Genes Encoding the Transcription/Translation Apparatus Are Differentially Transcribed Early in Barley (*Hordeum vulgare*) Chloroplast Development (Evidence for Selective Stabilization of *psbA* mRNA). *Plant Physiol* **101**, 781-791.

Beick, S., Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R., Jensen, B. und Barkan, A. (2008). The pentatricopeptide repeat protein PPR5 stabilizes a specific tRNA precursor in maize chloroplasts. *Mol Cell Biol* **28**, 5337-5347.

Bellaoui, M., Keddie, J. S. und Gruissem, W. (2003). DCL is a plant-specific protein required for plastid ribosomal RNA processing and embryo development. *Plant Mol Biol* **53**, 531-43.

- Belostotsky, D. A.** (2003). Unexpected Complexity of Poly(A)-Binding Protein Gene Families in Flowering Plants: Three Conserved Lineages That Are at Least 200 Million Years Old and Possible Auto- and Cross-Regulation. *Genetics* **163**.
- Benoit, R. M., Meisner, N.-C., Kallen, J., Graff, P., Hemmig, R., Cèbe, R., Ostermeier, C., Widmer, H. und Auer, M.** (2010). The X-ray Crystal Structure of the First RNA Recognition Motif and Site-Directed Mutagenesis Suggest a Possible HuR Redox Sensing Mechanism. *Journal of Molecular Biology* **397**, 1231–1244.
- Bollenbach, T. J., Lange, H., Gutierrez, R., Erhardt, M., Stern, D. B. und Gagliardi, D.** (2005). RNR1, a 3'–5' exoribonuclease belonging to the RNR superfamily, catalyzes 3' maturation of chloroplast ribosomal RNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* **33**, 2751–2763.
- Bonen, L. und Vogel, J.** (2001). The ins and outs of group II introns. *Trends in Genetics* **17**, 322–331.
- Castandet, B. und Araya, A.** (2011). RNA editing in plant organelles. Why make it easy? *Biochemistry (Moscow)* **76**, 924–931.
- Chateigner-Boutin, A. L., Ramos-Vega, M., Guevara-Garcia, A., Andres, C., de la Luz Gutierrez-Nava, M., Cantero, A., Delannoy, E., Jimenez, L. F., Lurin, C., Small, I. D.** (2008). CLB19, a pentatricopeptide repeat protein required for editing of *rpoA* and *clpP* chloroplast transcripts. *Plant J* **56**, 590–602.
- Chateigner-Boutin, A.-L. und Small, I. D.** (2007). A rapid high-throughput method for the detection and quantification of RNA editing based on high-resolution melting of amplicons. *Nucleic Acids Research* **35**.
- Chi, W., Mao, J., Li, Q., Ji, D., Zou, M., Luand, C. und Zhang, L.** (2010). Interaction of the pentatricopeptide-repeat protein DELAYED GREENING 1 with sigma factor SIG6 in the regulation of chloroplast gene expression in *Arabidopsis cotyledons*. *The Plant Journal* **64**, 14–25.
- Cho, W. K., Geimer, S. und Meurer, J.** (2009). Cluster Analysis and Comparison of Various Chloroplast Transcriptomes and Genes in *Arabidopsis thaliana*. *DNA Research* **16**, 31–44.
- Churin, Y., Hess, W. R. und Börner, T.** (1999). Cloning and characterization of three cDNAs encoding chloroplast RNA-binding proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.): differential regulation of expression by light and plastid development. *Curr Genet* **36**, 173–81.
- Cook, W. B. und Walker, J. C.** (1992). Identification of a maize nucleic acid-binding protein (NBP) belonging to a family of nuclear-encoded chloroplast proteins. *Nucleic Acids Research* **20**, 359–364.

- Courtois, F., Merendino, L., Demarsy, E., Mache, R. und Lerbs-Mache, S.** (2007). Phage-Type RNA Polymerase RPOTmp Transcribes the *rrn* Operon from the PC Promoter at Early Developmental Stages in Arabidopsis. *Plant Physiology* **145**, 712-721.
- Daròs, J.-A. und Flores, R.** (2002). A chloroplast protein binds a viroid RNA in vivo and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. *The EMBO Journal* **21**, 749-759.
- De Longevialle, A. F., Hendrickson, L., Taylor, N. L., Delannoy, E., Lurin, C., Badger, M., Millar, A. H. und Small, I. D.** (2008). The pentatricopeptide repeat gene OTP51 with two LAGLIDADG motifs is required for the *cis*-splicing of plastid *ycf3* intron 2 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **56**, 157-168.
- Deng, X. W. und Gruissem, W.** (1987). Control of plastid gene expression during development: the limited role of transcriptional regulation. *Cell* **49**, 379-87.
- Desai, U. J. und Pfaffle, P. K.** (1995). Single-step purification of a thermostable DNA polymerase expressed in Escherichia coli. *BioTechniques* **19**, 780-784.
- Ding, S., Lei, M., Lu, Q., Zhang, A., Yin, Y., Wen, X., Zhang, L. und Lu, C.** (2012). Enhanced sensitivity and characterization of photosystem II in transgenic tobacco plants with decreased chloroplast glutathione reductase under chilling stress. *Biochimica et Biophysica Acta* **1817**, 1979-1991.
- Dreyfuss, G., Matunis, M. J., Pinol-Roma, S. und Burd, C. G.** (1993). hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annual Review of Genetics* **62**, 289-321.
- Edwards, K., Johnstone, C. und Thompson, C.** (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* **19**, 1349. *EMBO Journal* **2**, 33-38.
- Fargo, D. C., Zhang, M., Gillham, N. W. und Boynton, J. E.** (1998). Shine-Dalgarno-like sequences are not required for translation of chloroplast mRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts or in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **257**, 271-282.
- Gauss, D. H. und Sprinzl, M.** (1983). Compilation of tRNA sequences. *Nucleic Acids Research* **11**, r1-r53.
- Gott, J. M. und Emeson, R. B.** (2000). FUNCTIONS AND MECHANISMS OF RNA EDITING. *Annu. Rev. Genet* **34**, 499-531.
- Gray, M. W.** (1993). Origin and evolution of organelle genomes. *Curr Opin Genet Dev* **3**, 884-90.
- Grennan, A. K. und Ort, D. R.** (2007). Cool temperatures interfere with D1 synthesis in tomato by causing ribosomal pausing. *Photosynthesis Research* **94**, 375-385.

- Gruissem, W., Barkan, A., Deng, X. und Stern, D.** (1988). Transcriptional and posttranscriptional control of plastid mRNA levels in higher plants. *Trends in Genetics* **4**, 258-263.
- Gutell, R. R.** (1994). Collection of small subunit (16S- and 16S-like) ribosomal RNA structures: 1994. *Nucleic Acids Research* **22**, 3502-3507.
- Hajdukiewicz, P. T., Allison, L. A. und Maliga, P.** (1997). The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *The EMBO Journal* **16**, 4041-8.
- Hayes, R., Kudla, J., Schuster, G., Gabay, L., Maliga, P. und Gruissem, W.** (1996). Chloroplast mRNA 3'-end processing by a high molecular weight protein complex is regulated by nuclear encoded RNA binding proteins. *The EMBO Journal* **15**, 1132-41.
- Hirose, T. und Sugiura, M.** (2001). Involvement of a site-specific trans-acting factor and a common RNA-binding protein in the editing of chloroplast mRNAs: development of a chloroplast in vitro RNA editing system. *The EMBO Journal* **20**, 1144-1152.
- Hirose, T., Kusumegi, T. und Sugiura, M.** (1998). Translation of tobacco chloroplast rps14 mRNA depends on a Shine-Dalgarno-like sequence in the 5'-untranslated region but not on internal RNA editing in the coding region. *FEBS Letters* **430**, 257-260.
- Hoffmann, M.** (2002). Biogeography of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). *Journal of Biogeography* **29**, 125-134.
- Hopkins, W. G. und Elfman, B.** (1984). Temperature-induced chloroplast ribosome deficiency in virescent maize. *Journal of Heredity* **75**, 207-211.
- Jonak, C., Ökrész, L., Bögre, L. und Hirt, H.** (2002). Complexity, Cross Talk and Integration of Plant MAP Kinase Signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 415-424.
- Kanekatsu, M., Munakata, H., Furuzono, K. und Ohtsuki, K.** (1993). Biochemical characterization of a 34 kDa ribonucleoprotein (p34) purified from the spinach chloroplast fraction as an effective phosphate acceptor for casein kinase II. *FEBS Letters* **335**, 176-180.
- Karcher, D. und Bock, R.** (2002). Temperature sensitivity of RNA editing and intron splicing reactions in the plastid *ndhB* transcript. *Curr Genet* **41**, 48-52.
- Kessler, M. M., Henry, M. F., Shen, E., Zhao, J., Gross, S., Silver, P. A. und Moore, C. L.** (1997). Hrp1, a sequence-specific RNA-binding protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm, is required for mRNA 3'-end formation in yeast. *Genes & Development* **11**, 2545-2556.
- Keus, R. J. A., Dekker, A. F., Kreuk, K. C. J. und Groot, G. S. P.** (1984). Transcription of ribosomal DNA in chloroplasts of *Spirodela oligorhiza*. *Current Genetics* **9**, 91-97.

- Khrouchtchova, A., Monde, R.-A. and Barkan, A.** (2012). A short PPR protein required for the splicing of specific group II introns in angiosperm chloroplasts. *RNA* **18**, 1197-1209.
- Kiledjian, M., DeMaria, C. T., Brewer, G. und Novick, K.** (1997). Identification of AUF1 (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein D) as a Component of the α -Globin mRNA Stability Complex. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 4870-4876.
- Klaff, P. und Gruissem, W.** (1991). Changes in Chloroplast mRNA Stability during Leaf Development. *Plant Cell* **3**, 517-529.
- Kleffmann, T., von Zychlinski, A., Russenberger, D., Hirsch-Hoffmann, M., Gehrig, P., Gruissem, W. und Baginsky, S.** (2007). Proteome Dynamics during Plastid Differentiation in Rice. *Plant Physiology* **143**, 912-923.
- Knoop, V.** (2010). When you can't trust the DNA: RNA editing changes transcript sequences. *Cell Mol Life Sci.*
- Kotera, E., Tasaka, M. und Shikanai, T.** (2005). A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* **433**, 326-330.
- Kozak, M.** (1983). Comparison of Initiation of Protein Synthesis in Prokaryotes, Eucaryotes, and Organelles. *Microbiol Rev* **47**, 1-45.
- Kudla, J., Hayes, R. und Gruissem, W.** (1996). Polyadenylation accelerates degradation of chloroplast mRNA. *The EMBO Journal* **15**, 7137-46.
- Kunst, L.** (1998). Preparation of physiologically active chloroplasts from *Arabidopsis*. *Methods Mol Biol* **82**, 43-48.
- Kurihara-Yonemoto, S. und Kubo, T.** (2010). Increased accumulation of intron-containing transcripts in rice mitochondria caused by low temperature: is cold-sensitive RNA editing implicated? *Current Genetics* **56**, 529-541.
- Kusumi, K., Sakata, C., Nakamura, T., Kawasaki, S., Yoshimura, A. und Iba, K.** (2011). A plastid protein NUS1 is essential for build-up of the genetic system for early chloroplast development under cold stress conditions. *The Plant Journal* **68**, 1039-1050.
- Kutschera, U. und Niklas, K. J.** (2004). The modern theory of biological evolution: an expanded synthesis. *Naturwissenschaften* **91**, 255-276.
LAGLIDADG motifs is required for the cis-splicing of
- Li, Y. und Sugiura, M.** (1990). Three distinct ribonucleoproteins from tobacco chloroplasts: each contains a unique amino terminal acidic domain and two ribonucleoprotein consensus motifs. *The EMBO Journal* **9**, 3059-3066.

- Li, Y. und Sugiura, M.** (1991). Nucleic acid-binding specificities of tobacco chloroplast ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Research* **19**, 2893-2896.
- Lisitsky, I. und Schuster, G.** (1995). Phosphorylation of a chloroplast RNA-binding protein changes its affinity to RNA. *Nucleic Acids Research* **23**, 2506-2511.
- Lisitsky, I., Liveanu, V. und Schuster, G.** (1994). RNA-binding activities of the different domains of a spinach chloroplast ribonucleoprotein. *Nucleic Acids Research* **22**, 4719-4724.
- Lisitsky, I., Liveanu, V. und Schuster, G.** (1995). RNA-Binding Characteristics of a Ribonucleoprotein from Spinach Chloroplast. *Plant Physiology* **107**, 933-941.
- Liu, X., Rodermel, S. R. und Yu, F.** (2010a). A var2 leaf variegation suppressor locus, SUPPRESSOR OF VARIEGATION3, encodes a putative chloroplast translation elongation factor that is important for chloroplast development in the cold. *BMC Plant Biology* **10**, 1-18.
- Liu, X., Yu, F. und Rodermel, S. R.** (2010b). An arabidopsis pentatricopeptide repeat protein, SUPPRESSOR OF VARIEGATION7, is required for FtsH-mediated chloroplast biogenesis. *Plant Physiology* **154**, 1588-1601.
- Lorkovic, Z. J. und Barta, A.** (2002). Genome analysis: RNA recognition motif (RRM) and K homology (KH) domain RNA-binding proteins from the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research* **30**, 623-635.
- Loza-Tavera, H., Vargas-Suárez, M., E., D.-M., Torres-Márquez, M. E., González de la Vara, L. E., Moreno-Sánchez, R. und Gruissem, W.** (2006). Phosphorylation of the spinach chloroplast 24 kDa RNA-binding protein (24RNP) increases its binding to petD and psbA 3' untranslated regions. *Biochimie* **88**, 1217-1228.
- Lunde, B. M., Moore, C. und Varani, G.** (2007). RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 479-490.
- Manuell, A., Beligni, M. V., Yamaguchi, K. und Mayfield, S. P.** (2004). Regulation of chloroplast translation: interactions of RNA elements, RNA-binding proteins and the plastid ribosome. *Biochemical Society Transactions* **32**, 601-605.
- Margulis, L.** (1970). Origin of eukaryotic cells : evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the Precambrian earth. xxii, 349 p
- Maris, C., Dominguez, C. und Allain, F. H.-T.** (2005). The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS Journal* **272**, 2118-2131.

- Maruyama, K., Sato, N. und Ohta, N.** (1999). Conservation of structure and cold-regulation of RNA-binding proteins in cyanobacteria: probable convergent evolution with eukaryotic glycine-rich RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Research* **27**, 2029-2036.
- Mathy, N., Bénard, L., Pellegrini, O., Daou, R., Wen, T. und Condon, C.** (2007). 5'-to-3' Exoribonuclease Activity in Bacteria: Role of RNase J1 in rRNA Maturation and 5' Stability of mRNA. *Cell* **129**, 681-692.
- Mayeda, A., Munroe, S. H., Cáceres, J. F. und Krainer, A. R.** (1994). Function of conserved domains of hnRNP A1 and other hnRNP A/B proteins. *The EMBO Journal* **13**, 5483-5495.
- Mayfield, S. P., Cohen, A., Danon, A. und Yohn, C. B.** (1994). Translation of the psbA mRNA of *Chlamydomonas reinhardtii* requires a structured RNA element contained within the 5' untranslated region. *J Cell Biol* **127**, 1537-45.
- McFadden, G. I.** (2001). Chloroplast origin and integration. *Plant Physiol* **125**, 50-3.
- Meierhoff, K., Felder, S., Nakamura, T., Bechtold, N. und Schuster, G.** (2003). HCF152, an *Arabidopsis* RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast *psbB-psbT-psbH-petB-petD* RNAs. *Plant Cell* **15**, 1480-1495.
- Michel, F. und Dujon, B.** (1983). Conservation of RNA secondary structures in two intron families including mitochondrial-, chloroplast- and nuclear-encoded members. *The EMBO Journal* **2**, 33-38.
- Millerd, A., Goodchild, D. J. und Spencer, D.** (1969). Studies on a maize mutant sensitive to low temperature. II. Chloroplast structure, development, and physiology. *Plant Physiology* **44**, 567-583.
- Minvielle-Sebastia, L., Beyer, K., Krecic, A. M., Hector, R. E., Swanson, M. S. und Keller, W.** (1998). Control of cleavage site selection during mRNA 3' end formation by a yeast hnRNP. *The EMBO Journal* **17**, 7454-7468.
- Mullet, J. E.** (1993). Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiol* **103**, 309-13.
- Nagashima, A., Hanaoka, M., Motohashi, R., Seki, M., Shinozaki, K., Kanamaru, K., Takahashi, H. und Tanaka, K.** (2004). DNA Microarray Analysis of Plastid Gene Expression in an *Arabidopsis* Mutant Deficient in a Plastid Transcription factor Sigma, SIG2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 694-704.
- Nakamura, T. und Sugita, M.** (2008). A conserved DYW domain of the pentatricopeptide repeat protein possesses a novel endoribonuclease activity. *FEBS Lett* **582**, 4163-4168.

- Nakamura, T., Ohta, M., Sugiura, M. und Sugita, M.** (1999). Chloroplast ribonucleoproteins are associated with both mRNAs and intron-containing precursor tRNAs. *FEBS Letters* **460**, 437-441.
- Nakamura, T., Ohta, M., Sugiura, M. und Sugita, M.** (2001). Chloroplast ribonucleoproteins function as a stabilizing factor of ribosome-free mRNAs in the stroma. *J Biol Chem* **276**, 147-152.
- Ni, R. J., Shen, Z., Yang, C. P., Wu, Y. D., Bi, Y. D. und Wang, B. C.** (2010). Identification of low abundance polyA-binding proteins in Arabidopsis chloroplast using polyA-affinity column. *Molecular biology reports* **37**, 637-641.
- Nishimura, K., Ashida, H., Ogawa, T. und Yokota, A.** (2010). A DEAD box protein is required for formation of a hidden break in Arabidopsis chloroplast 23S rRNA. *The Plant Journal* **63**, 766-777.
- Ohta, M., Sugita, M. und Sugiura, M.** (1995). Three types of nuclear genes encoding chloroplast RNA-binding proteins (cp29, cp31 and cp33) are present in Arabidopsis thaliana: presence of cp31 in chloroplasts and its homologue in nuclei/cytoplasms. *Plant Molecular Biology* **27**, 529-539.
- Okuda, K., Chateigner-Boutin, A. L., Nakamura, T., Delannoy, E., Sugita, M., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K., Small, I. D. und Shikanai, T.** (2009). Pentatricopeptide repeat proteins with the DYW motif have distinct molecular functions in RNA editing and RNA cleavage in Arabidopsis chloroplasts. *Plant Cell* **21**, 146-56.
- Ostheimer, G. J., Williams-Carrier, R., Belcher, S., Osborne, E., Gierke, J. und Barkan, A.** (2003). Group II intron splicing factors derived by diversification of an ancient RNA-binding domain. *The EMBO Journal* **22**, 3919-3929.
- Palmer, J. D.** (1985). Comparative Organization of Chloroplast Genomes. *Annual Review of Genetics* **19**, 325-354.
- Petersen, K., Schöttler, M. A., Karcher, D., Thiele, W. und Bock, R.** (2011). Elimination of a group II intron from a plastid gene causes a mutant phenotype. *NucleicAcidsResearch* **39**, 5181-5192.
- Pfalz, J., Bayraktar, O. A., Prikryl, J. und Barkan, A.** (2009). Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts. *The EMBO Journal* **28**, 2042-2052.
- Pfannschmidt, T., Bräutigam, K., Wagner, R., Dietzel, L., Schröter, Y., Steiner, S. und Nykytenko, A.** (2009). Potential regulation of gene expression in photosynthetic cells by redox and energy state: approaches towards better understanding. *Annals of Botany* **103**.
plastid ycf3 intron 2 in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **56**, 157-168.

- Price, S. R., Evans, P. R. und Nagai, K.** (1998). Crystal structure of the spliceosomal U2B''–U2A' protein complex bound to a fragment of U2 small nuclear RNA. *Nature* **394**, 645-650.
- Prikryl, J., Watkins, K. P., Friso, G., van Wijk, K. J. und Barkan, A.** (2008). A member of the Whirly family is a multifunctional RNA- and DNA-binding protein that is essential for chloroplast biogenesis. *Nucleic Acids Res* **36**, 5152-5165.
- Reiland, S., Messerli, G., Baerenfaller, K., Gerrits, B., Endler, A., Grossmann, J., Gruissem, W. und Baginsky, S.** (2009). Large-Scale Arabidopsis Phosphoproteome Profiling Reveals Novel Chloroplast Kinase Substrates and Phosphorylation Networks. *Plant Physiology* **150**, 889-903.
- Rich, A. und RajBhandar, U. L.** (1976). Transfer RNA: molecular structure, sequence, and properties. *Annual Review of Genetics* **45**, 805-860.
- Robbins, J. C., Heller, W. P. und Hanson, M. R.** (2009). A comparative genomics approach identifies a PPR-DYW protein that is essential for C-to-U editing of the Arabidopsis chloroplast accD transcript. *RNA* **15**, 1142-1153.
- Rogalski, M., Ruf, S. und Bock, R.** (2006). Tobacco plastid ribosomal protein S18 is essential for cell survival. *Nucleic Acids Res* **34**, 4537-4545.
- Rogalski, M., Schottler, M. A., Thiele, W., Schulze, W. X. und Bock, R.** (2008). Rpl33, a nonessential plastid-encoded ribosomal protein in tobacco, is required under cold stress conditions. *Plant Cell* **20**, 2221-37.
- Ruf, M. und Kössel, H.** (1988). Occurrence and spacing of ribosome recognition sites in mRNAs of chloroplasts from higher plants. *FEBS Letters* **240**, 41-44.
- Ruf, S., Kossel, H. und Bock, R.** (1997). Targeted inactivation of a tobacco intron-containing open reading frame reveals a novel chloroplast-encoded photosystem I-related gene. *J Cell Biol* **139**, 95-102.
- Rüdinger, M., Szovényi, P., Rensing, S. A. und Knoop, V.** (2011). Assigning DYW-type PPR proteins to RNA editing sites in the funariid mosses *Physcomitrella patens* and *Funaria hygrometrica*. *The Plant Journal* **67**, 370-380.
- Rüdinger, M., Volkmar, U., Lenz, H., Groth-Malonek, M. und Knoop, V.** (2012). Nuclear DYW-Type PPR Gene Families Diversify with Increasing RNA Editing Frequencies in Liverwort and Moss Mitochondria. *Journal of Molecular Evolution* **74**, 37-51.
- Ruwe, H., Kupsch, C., Teubner, M. und Schmitz-Linneweber, C.** (2011). The RNA-recognition motif in chloroplasts. *Journal of Plant Physiology* **168**, 1361-1371.

- Salone, V., Rüdinger, M., Polsakiewicz, M., Hoffmann, B., Groth-Malonek, M., Szurek, B., Small, I. D., Knoop, V. und Lurin, C.** (2007). A hypothesis on the identification of the editing enzyme in plant organelles. *FEBS Letters* **581**, 4132-4138.
- Sambrook, J. und Russell, D. W.** (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E. und Tabata, S.** (1999). Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res* **6**, 283-90.
- Scharff, L. B., Childs, L., Walther, D. und Bock, R.** (2011). Local Absence of Secondary Structure Permits Translation of mRNAs that Lack Ribosome-Binding Sites. *PLoS Genet* **7**, e1002155.
- Schellenberg, M. J., Edwards, R. A., Ritchie, D. B., Kent, O. A., Golas, M. M., Stark, H., Lührmann, R., Glover, J. N. M. und MacMillan, A. M.** (2006). Crystal structure of a core spliceosomal protein interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1266-1271.
- Schmitz-Linneweber, C. und Barkan, A.** (2007). RNA splicing and RNA editing in chloroplasts. In *Cell and Molecular Biology of Plastids*, vol. 19/2007, (ed. R. Bock), pp. 213-248. Berlin: Springer Verlag.
- Schmitz-Linneweber, C. und Small, I. D.** (2008). Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci* **13**, 663-670.
- Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R. E., Williams-Voelker, P. M., Kroeger, T. S., Vichas, A. und Barkan, A.** (2006). A pentatricopeptide repeat protein facilitates the *trans*-splicing of the maize chloroplast *rps12* pre-mRNA. *Plant Cell* **18**, 2650-2663.
- Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R. und Barkan, A.** (2005). RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast Pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *Plant Cell* **17**, 2791-2804.
- Schuster, G. und Gruissem, W.** (1991). Chloroplast mRNA 3' end processing requires a nuclear-encoded RNA-binding protein. *The EMBO Journal* **10**, 1493-502.
- Schuster, G., Lisitsky, I. und Klaff, P.** (1999). Polyadenylation and Degradation of mRNA in the Chloroplast. *Plant Physiology* **120**, 937-944.
- Schweer, J., Geimer, S., Meurer, J. und Link, G.** (2009). Arabidopsis Mutants Carrying Chimeric Sigma Factor Genes Reveal Regulatory Determinants for Plastid Gene Expression *Plant & Cell Physiology* **50**, 1382-1386.

- Small, I. D. und Peeters, N.** (2000). The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci* **25**, 46-47.
- Stern, D. B., Goldschmidt-Clermont, M. und Hanson, M. R.** (2010). Chloroplast RNA metabolism. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 125-155.
- Stern, D. und Gruissem, W.** (1987). Control of Plastid Gene Expression: 3' Inverted Repeats Act as mRNA Processing and Stabilizing Elements, but Do Not Terminate Transcription. *Cell* **51**, 1145-1157.
- Strand, A., Hurry, V., Henkes, S., Huner, N., Gustafsson, P., Gardeström, P. und Stitt, M.** (1999). Acclimation of Arabidopsis Leaves Developing at Low Temperatures. Increasing Cytoplasmic Volume Accompanies Increased Activities of Enzymes in the Calvin Cycle and in the Sucrose-Biosynthesis Pathway. *Plant Physiology* **119**, 1387-1397.
- Sugiura, M.** (1992). The chloroplast genome. *Plant Mol Biol* **19**, 149-68.
- Swiatecka-Hagenbruch, M., Liere, K. und Börner, T.** (2007). High diversity of plastidial promoters in Arabidopsis thaliana. *Mol Genet Genomics* **277**, 725-34.
- Teige, M., Scheikl, E., Euglem, T., Dóczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J. L. und Hirt, H.** (2004). The MKK2 Pathway Mediates Cold and Salt Stress Signaling in Arabidopsis. *Molecular Cell* **15**, 141-152.
- Till, B., Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R. und Barkan, A.** (2001). CRS1 is a novel group II intron splicing factor that was derived from a domain of ancient origin. *RNA* **7**, 1227-1238.
- Tillich, M., Funk, H. T., Schmitz-Linneweber, C., Poltnigg, P., Sabater, B., Martin, M. und Maier, R. M.** (2005). Editing of plastid RNA in *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Plant J* **43**, 708-715.
- Tillich, M., Hardel, S. L., Kupsch, C., Armbruster, U., Delannoy, E., Gualberto, J. M., Lehwark, P., Leister, D., Small, I. D. und Schmitz-Linneweber, C.** (2009). Chloroplast ribonucleoprotein CP31A is required for editing and stability of specific chloroplast mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6002-6007.
- Tillich, M., Lehwark, P., Morton, B. R. und Maier, U. G.** (2006). The evolution of chloroplast RNA editing. *Mol Biol Evol* **23**, 1912-1921.
- Tjus, S. E., Lindberg-Møller, B. und Scheller, H. V.** (1998). Photosystem I Is an Early Target of Photoinhibition in Barley Illuminated at Chilling Temperatures. *Plant Physiology* **116**, 755-764.

- Tokuhisa, J. G., LaBrie, S. T., Feldmann, K. A. und Browse, J. A. (1997).** Mutational analysis of chilling tolerance. *Plant Cell Environ.* **20**, 742-751.
- Tokuhisa, J. G., Vijayan, P., Feldmann, K. A. und Browse, J. A. (1998).** Chloroplast Development at Low Temperatures Requires a Homolog of DIM1, a Yeast Gene Encoding the 18S rRNA Dimethylase. *The Plant Cell* **10**, 699–711.
- Tsudzuki, T., Wakasugi, T. und Sugiura, M. (2001).** Comparative Analysis of RNA Editing Sites in Higher Plant Chloroplasts. *JOURNAL OF MOLECULAR EVOLUTION* **53**, 327-332.
- Walter, M., Kilian, J. und Kudla, J. (2002).** PNPase activity determines the efficiency of mRNA 3'-end processing, the degradation of tRNA and the extent of polyadenylation in chloroplasts. *EMBO Journal* **21**, 6905-6914.
- Wang, B.-C., Wang, H.-X., Feng, J.-X., Meng, D.-Z., Qu, L.-J. und Zhu, Y.-X. (2006).** Post-translational modifications, but not transcriptional regulation, of major chloroplast RNA-binding proteins are related to Arabidopsis seedling development. *Proteomics* **6**, 2555-2563.
- Wostrikoff, K., Choquet, Y., Wollmann, F.-A. und Girard-Bascou, J. (2001).** TCA1, a Single Nuclear-Encoded Translational Activator Specific for petA mRNA in *Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplast. *Genetics* **159**, 119-132.
- Yang, X., Bani, M.-R., Lu, S.-J., Rowan, S., Ben-Davis, Y. und Chabot, B. (1994).** The Al and AIB proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins modulate 5' splice site selection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6924-6928.
- Yang, Q., Coseno, M., Gilmartin, G. M. und Doublié, S. (2011).** Crystal Structure of a Human Cleavage Factor CFIm245/CFIm68/RNA Complex Provides an Insight into Poly(A) Site Recognition and RNA Looping. *Structure* **19**.
- Ye, L. und Sugiura, M. (1992).** Domains required for nucleic acid binding activities in chloroplast ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Research* **20**, 6275-6279.
- Yohn, C. B., Cohen, A., Danon, A. und Mayfield, S. P. (1998).** A poly(A) binding protein functions in the chloroplast as a message-specific translation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2238-2243.
- Zhang, S. und Scheller, H. V. (2004).** Photoinhibition of photosystem I at chilling temperature and subsequent recovery in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* **45**, 1595-602.
- Zhang, W., Wagner, B. J., Ehrenmann, K., Schaefer, A. W., DeMaria, C. T., Crater, D., DeHaven, K., Long, L. und Brewer, G. (1993).** Purification, Characterization, and cDNA Cloning of an AU-Rich Element RNA-Binding Protein, AUF1. *Molecular and Cellular*

Biology **13**, 7652-7665.

Zhou, W., Cheng, Y., Yap, A., Chateigner-Boutin, A.-L., Delannoy, E., Hammani, K., Small, I. D. und Huang, J. (2009). The Arabidopsis gene YS1 encoding a DYW protein is required for editing of rpoB transcripts and the rapid development of chloroplasts during early growth. *The Plant Journal* **58**, 82-96.

Zubo, Y. O. und Kusnetsov, V. V. (2008). Application of Run-on Transcription Method for Studying the Regulation of Plastid Genome Expression. *Russian Journal of Plant Physiology* **55**, 107-114.

Anhang 1**Tabelle 1** Liste aller Unternehmen von denen Materialien für diese Arbeit verwendet wurden.

Amersham Bioscience	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Applied Biosystems	Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA
ARBC	Arabidopsis Biological Research Center, Columbus, Ohio
Biometra®	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Corning	Corning Inc., Acton, MA, USA
Eurofins MWG Operon	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Fermentas	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Franz Eckert GmbH	Franz Eckert GmbH, Waldkirch, Deutschland
GABI	Genomanalyse im biologischen System Pflanze, Potsdam, Deutschland
GE Healthcare	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Hartmann Analytic	HARTMANN ANALYTIC GmbH, Braunschweig, Deutschland
Invitrogen	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MJ Research	MJ Research Inc., St. Bruno (Quebec), Kanada
NASC	Nottingham <i>Arabidopsis</i> Stock Centre, Loughborough, Großbritannien
National Diagnostics	National Diagnostics U.S.A., Atlanta, Georgia 30336, USA
NEB	New England Biolabs, Ipswich, MA, US
PerkinElmer	PerkinElmer LAS (Deutschland) GmbH, Rodgau, Deutschland
Roche	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Roth	C. Roth GMBH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
SMB	Services in Molecular Biology GmbH, Rüdersdorf, Deutschland
Thermo Scientific	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Whatman	Whatman Paper, Maidstone, Großbritannien

Tabelle 2 Oligonukleotide, die für die Herstellung der RNA-Sonden für Northern, bzw. *Dot-Blot* Analysen verwendet wurden.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	RNA-Sonde	Anwendung
accD_for	TTCATTGTAGTGAAAGCGG	<i>accD</i>	Northern
accD_T7_rev	GTAATACGACTCACTATAGGGTTCGCCTACTACGGATCCC		
atpB_for2	GGAATGGACGTGGTTGATATGG	<i>atpB</i>	<i>Dot-Blot</i>
atpB_T7_rev2	TAATACGACTCACTATAGGGCAGTCAGACCAACTCTCATACG		
atpH5'_for	GATTTAGATAGGGATTCGATTAG	<i>atpH</i>	<i>Dot-Blot</i>
atpH5'_T7_rev	GTAATACGACTCACTATAGGGTCCAGGTCCAATAGAGCAAG		
clpP_ex2_for	GAGGTGATACCGAAATCTCG	<i>clpP</i>	Northern
clpP_ex2_T7_rev	GTAATACGACTCACTATAGGGCGTTTGGTAATTGCTCTCC		
ndhB_ex1_for	CTGAGCAATCGCAATAATCG	<i>ndhB</i>	Northern
ndhB_ex1_T7_rev	GTAATACGACTCACTATAGGGTACCGGAAGTATAACATTCG		
ndhF_3'UTR_for	TCGAACGTGGAATTCATCATC	<i>ndhF</i>	Northern und <i>Dot-Blot</i>
ndhF_3'UTR_T7_rev	GTAATCGACTCACTATAGGGTGAGAAATTCTATGGCTCGAATC		
petB_for	CGTCCAACCGTTACTGAAGC	<i>petB</i>	Northern
petB_T7_rev	GTAATACGACTCACTATAGGGAATAGCGTCAGGTACACC		
psaA_for	TGGCATGTATTCCATGGTG	<i>psaA</i>	Northern und <i>Dot-Blot</i>
psaA_T7_rev	GTAATCGACTCACTATAGGGAACCAAGCCAATTTTGAG		
psbB_for	TTTGACGCTTTTGTGTGTGC	<i>psbB</i>	Northern und <i>Dot-Blot</i>
psbB_T7_rev	GTAATACGACTCACTATAGGGCTTCTAAACGGGACGTCAGC		
psbD_for	CTATTCGCTTTAGGGGGTTGG	<i>psbD</i>	Northern und <i>Dot-Blot</i>
psbD_T7_rev	TAATACGACTCACTATAGGGCAGCAATGGGACCAGAGAATGC		
psbF_for	GTCTGGAAGCACAGGAGAACG	<i>psbF</i>	Northern
psbF_T7_rev	GTAATACGACTCACTATAGGGCAAAACGGCCTGTATTAAATGG		
rbcL_for	GCAGCATTCCGAGTAACTCC	<i>rbcL</i>	Northern und <i>Dot-Blot</i>
rbcL_T7_rev	GTAATACGACTCACTATAGGGCCACGTAGACATTCATAAACTGC		
rpl33_for	ATGGCCAAGGGTAAAGATGTTCG	<i>rpl33</i>	Northern- und <i>Dot-Blot</i>
rpl33_T7_rev	GTAATACGACTCACTATAGGGCTCAATTCCAATCGACTAGG		
rpoC1_for	TTGGACCTATAAAGAGTGGAATTTG	<i>rpoC1</i>	Northern
rpoC1_T7_rev	GTATTACGACTCACTATAGGGAGGTCTTCTTTTCACGAGGTACG		
rps4_rp	CGTCTGGGGGCTTTACGGG	<i>rps4</i>	Northern
rps4_T7	GTAATACGACTCACTATAGGGTGGTTTGCAATTCCTCAGGGGC		

rrn16_for	ATGGATACTAGGCGCTGTGC	16S-rRNA	Northern und Dot-Blot
rrn16_T7_rev	GTAATCGACTCACTATAGGGACCTCCTCCGGCTTATCAC		
rrn23_3'_for	GCAAGACCCACCCGTCGAGC	23S- rRNA	Northern
rrn23_3'_T7_rev	GTAATCGACTCACTATAGGGCGCTCCGCACTTGGCTACCC		
trnIex1	TTATCAGGGGCGCGCTCTACCACTGAGCTAATAGCCC	<i>trnI</i>	<i>Dot-Blot</i>
ycf3_exon2_for	CGGATGTCGGCTCAATCTGAAGG	<i>ycf3</i>	Northern
ycf3_exon2_T7_rev	TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGGGTTTCGTTCTAATGCCCCGA		
ycf3_intron1_for	AGGGGAAGAAGCACTACGCCG	<i>ycf3</i>	Northern und Dot-Blot
ycf3_intron1_T7_rev	TAATACGACTCACTATAGGGAGACGGCTCCTCTTAAGTGCAT		

Tabelle 3 Sequenzen der für die Erstellung eines Arabidopsis-tiling-Arrays verwendeten Oligonukleotide sowie die Genompositionen der resultierenden PCR-Produkte.

PCR-Produkt	Oligonukleotid 1	Oligonukleotid 2	Genom-Position: Start	Genom-Position: Stop
H-psbA	GAACGACGGGAATTGAACC	TTGGGCTGATATTATTAACCGTG	7	497
psbA	TGTGAAATGGGTGCATAAGAA	GATCCCTACCTTATTGACCGC	850	1334
psbA-Kex2	TCAATATCTACTGGAGGAGCAGC	ATCCGACTAGTTCGGGGTTC	1263	1753
Kex2-matK	TTGAATACGATCCGTAGTGGG	GGGAAGACCAAGTCTTTCTTTA	1700	2177
matK-1	TTCTAGCATTGACTACGTACCAC	TGTATGTGAATACGAATCCATCTTT	2523	2929
matK-2	GGTTCACATCCTTAGTGGGAA	AACGAACAGAAACCTATTAAAGATAGAG	3321	3749
Kint	AGATACCTCATAAACAGGTAGACTGC	TGCTTTCCTGATCGGTACAAT	3686	4161
Kint-Kex1	TTCACCTTGACCCAAATTGGAA	TCATTGTATGAACTAATGAACCAAGA	4090	4577
IG_K-rps16	AAAGCTTAACCTCTTGTTTCATTAG	TCTACTCTTCTTTCACTTCCATCA	4541	5000
rps16ex2	AAATAAATATGATGGAAGTGAAAGAGAA	TTCTCGAGCCGTACGAGG	4966	5357
rps16ex2-in-ex1	ACCCACCTTACTAAGATCTCTTCTT	TTTAAACGATGTGGTAGAAAAGCA	5213	6174
rps16in-1	TTTGGCCTCGTACGGCT	TTTGTATAGAAAGAACAGAAATCATAAACA	5335	5779
rps16in-2	AAAGGGCAGCAACAAGCC	CGATGTGGTAGAAAGCAACG	5724	6167
rps16ex2-IG	CCACAGCAGATAATGTCCTTCA	CAATCTTCTATTGCCTTTGTACACC	6114	6596
Q	TTTAAACAGAAAGAGAAAGATGTG	AAATTGGTGTCTTGTGGATAATTT	6551	7011
psbK	AAATTAAATTATCCACAAGAACAACA	TCTAATTAGGTTCTTTCATTTAGGGAA	6982	7393
psbI-S	GGTAGCCATACTAAATCTGGATCA	GGGTTCGAATCCCTCTCTTT	7316	7807
IG-psbI-G-1	TCGAACCCTCGGTACGATTA	TTTGAGTTCGCGCCTTTTT	7800	8309

IG-psbI-G-2	GAACCTTCTCAGCAATTCTAGTT ACATT	AATCAAACCGAGAGACCCTTT	8239	8722
Gex1-in	CAATAATTGCATTGTAGCGGG	CAATATAATATGTCGATGTCTTT AGTAAACC	8630	9058
in-Gex2	GAGAACTTTGGTTTACTAAAGAC ATCG	GGCAATTGTGAATTTAGAGCG	9019	9448
Gex2-R	AAACCCTTAGCCTTCCAAGC	AAGCATTCAGAATTTCTTTCTTAT TCT	9380	9779
atpA-1	AAATAGAATAAGAAAGAAATTC TGAATGC	TGAAACAATCCCAATCAGCC	9749	10200
atpA-3	CCTGGATAAGCTTCACGACC	AGACGTTCTGTATATGAGCCTCT TC	10596	11044
atpA-atpFex2	ATTGCTCAATACGTTACGG	GAAGAACTGCGTGAAGGAGC	11404	11882
atpFex2-in	TCCGTTTCTACGTTACGCAAG	AAAGAAACAACCTTGCTGACAAT TA	11812	12234
atpFex2-in-ex1	TGAATAGCTCCTTCACGCAGT	TTAGCAACAAATCCAATAAATCT AAGTG	11857	12720
atpFin-ex1	TTCGGAGGATTCTTCTGACC	GTGTGTGTGAGTTGTTCAATTCA A	12177	12657
atpFex1-IG	CAGCCTATTCTTGAAATGAACAA C	GATTCGCTTCTCTCCTTCCC	12624	13130
atpH	GGGAAGGAAGAAAGCGAATC	TTACGTCCTAAGTCATTGGATGA T	13111	13574
atpH-IG	TCCAGGTCCAATAGAAGCAAG	TTTAGATTTAGATAGGGATTCTGA TTAGA	13433	13852
IG-atpI	GGAAGAACTTCTAATCGAATCCC	CGGAAATATATTAGCCGATGAA	13816	14192
atpI	AGGTATAGGAACCACTAAAGGT ACTAAAGA	CTTATTAGGTTCCGCAGTTCTAG C	14120	14618
atpI-rps2	GCCGTCAGTTGGAATTGTTT	GGGCCGTTCTAGCTATATACAAA	14561	15043
rps2	TTTGTATATAGCTAGAACGGCCC	GGCTGCAATACGGGCTC	15021	15466
rps2-IG	ACCAATTGTGAACATGCCG	TTGTTTGCTGTAGTCATTTGCTT	15399	15898
rpoC2-1	TTTATTAGTGTTAACAATTACG AAAGCA	GCGTGCTTTAGAAGAAGCAA	15852	16310
rpoC2-2	TTTATTAGTGTTAACAATTACG AAAGCA	TATTTGGCTACTCCGGGAGC	15852	16765
rpoC2-3	ATTGAATCAATCGAGCGGAC	AATGGCAAACCAACTCGAGG	16602	17617
rpoC2-4	AGATCAATCCCGAATCTGGC	TTCAGAATTGAATGGAACTTAG G	17395	18443
rpoC2-5	GATCAACCCGCCGACTT	TTCAGAATTGAATGGAACTTAG G	17948	18443
rpoC2-6	GATCAACCCGCCGACTT	AAGTGATTGCTGAGATTTCGC	17948	18810
rpoC2-7	AATTAGACTAGATCCACATG	GTATGAGAGGATTAATGTCG	18583	19626
rpoC2-rpoC1-1	CGTAAGATATCCAGCATCTG	TAGTCCTTTGTGGCTTCGGT	19460	20497
rpoC2-rpoC1-2	TCGTTTAATAGCAGTTCCATCTA TCA	TAGTCCTTTGTGGCTTCGGT	20006	20497
rpoC1ex1-1	ATCATATGAACAGGCTTGAG	GGGAATTAGTAATGTGTCAGGAA A	20257	21341
rpoC1ex1-2	GGATGTAAACAAATAGTGCGTCC	GGGAATTAGTAATGTGTCAGGAA A	20855	21341
rpoC1ex1-in	TTCGCAAATCTAAATCGGCT	CACTAAAGAATTTAAATAGAAAT CAAAGAAG	21666	22101
rpoC1ex1-in- ex2	ATTCAAATGAACCTCGTAATCGT AA	TATGGTATTTGAAACGTCTTCCT AGTTAT	21798	22738

rpoC1in	TCAAGTTCTCAGTGCAAACCA	AAAGGCGATTGGTCTATGGTC	22023	22497
rpoC1in-ex2	TTCACGAGGTACGCCTATCA	TTGGACCTATAAAGAGTGGAATT TG	22440	22903
rpoC1-rpoB-1	TTTCATCTCCGATCACTCGAT	TTTACAAGAGATGCTTACTTATA AATCTGA	22844	23321
rpoC1-rpoB-2	TTTCATCTCCGATCACTCGAT	TACTTGGCATTTCAGGTATCG	22844	24039
rpoB-1	CCACGGGTCTCCCGTCTTGC	AGCACGGATACGGATGCTTT	23779	24941
rpoB-2	GTTGATACATAATTAATGGAATG CTTAGAG	AGCACGGATACGGATGCTTT	24487	25791
rpoB-3	GCTCCGGAGATAGTTCCTT	TTCTAGTTCTATCATCAGCTATG GG	25302	25791
rpoB-4	AAATTTCAGGGTAGCAAACATTC	AAATTGAAGATATAGATCACGA AATTGA	25720	26211
rpoB-IG	TCAGAGGTTCTACCAATTGATAT GTT	AAACTCCGTAAGTTCAGCG	26140	26594
IG rpoB-C	AAGAAATAGATCCAAATGGAAC AGA	TCCCTTGAAGAGAACATTTC	26538	26993
IG-C	TTGTGGTACAGTTCTATTTGGGA	CTTACCACTCGGCCATGC	26924	27394
C-IG	GCATGGCCGAGTGGTAAG	AAATGAAAGGCAATTCTTAATCT AATC	27377	27784
IG-petN	CTCATGAAAGTCTCGGAATGC	AAGTATTCTAGAGTCCACTTCT TCCC	27716	28186
petN-IG	TGGGTGCTTTAATGGTAGTTT	AGCCATTATGGTTATTGTAATGT ATAAAGA	28110	28569
psbM	TCACTTGATCTTTATACATTACA ATAACCA	CTCCGATATTGTTATTCATGATAT TTCT	28531	28967
IG psbM-D-1	TCGCTTGTAACCTTACTCAGATG AA	TTTACCGGGACTCGTCTTTG	28890	29325
IG psbM-D-2	AACAAAGAAAGGGAATGTGACA A	TTAAGTGGGTAGAGAAACATAT GTAAATGA	29286	29683
D	CCCATACAGTATCTCTTCTTGA AGT	TCAATTGATTTGATAATAATGTA AGGATT	29608	30064
Y	CACTTTAGTGAGAGCAAGACGG	GGGTAGGGTACTACGAAAGGAA	30004	30470
E	CATCGACCCAGGAAGAATCTA	GAGGCAATCTATCAAGGAAAGT AAA	30398	30897
IG E-T	ACTTTCCTTGATAGATTGCCTCA	ACAATAGACGCATAGTGGTTAGT AGC	30876	31297
T	TGAAGTCAATTCAAATTCTCATT TC	TTTGGATTGTGCTGATTCTAATCT	31233	31705
IG T-psbD-1	GTCGTCTCTTGAATCGCCA	AGTTTCTTTCTCACATACACCTTC G	31631	32130
IG T-psbD-2	TCCATATTGATGCATCCGAG	TTTCATTTAATTGGTTTCGAAGAT	32068	32553
psbD-1	TCCGTTTACCTAAGTAAGGACCA	GAATGCGCTAAACTATTAGCAGG	32489	32976
psbD-2	CCAGTTCCTATTAGAAGGTTGC	TTTGCACCATCACCATCTTC	32904	33402
psbD-psbC	GGCTCTGCTATGCGCTATTC	GGCCACCAAGCGAA	33334	33830
psbC-1	TTAATGGAACCTTAGCTTTAGCT GG	GCCTTGAATACTAGAAGAAAGG CA	33769	34255
psbC-2	TTTGTTAGGTGTAGGTGCCTTTC	AAAGTAAATGCTTGAGCTTGAGA AG	34217	34669
psbC-S	TTTCCTATTCGTGGGTCATTT	AGACCTATTAAAGAAAGTCACAC CC	35024	35514
S-psbZ	AGAACATAGCCCTATGAGTTAAT ACGA	GATAAGAGAATTAAGGATACCC ACCA	35441	35933

IG psbZ-G	GAATTCATTCGTTGCAGATCC	ACGAGATACACTCTTTGGTTTGG	35938	36436
G-fM	CCAAACCAAAGAGTGTATCTCG	TTCTATGATCGATGAGGCC	36414	36905
fm-rps14	AAAGTTGCGGAGACAGGATTT	TCATTTGATTCGTCGATCCTC	36700	37181
rps14-psaB-1	TCCATTTCTCACTTAGCGACG	TTCTTAATTTCTGGCGTGG	37117	37593
rps14-psaB-2	TCCATTTCTCACTTAGCGACG	TTGCCCTGGCTGGTTAAATGC	37117	38100
psaB-1	ACCTCGTCCCGGACCATCGC	CCCGACTCGAGTAGTCATTATT T	37885	38871
psaB-2	AGCTCCTGTCATGATGAATCC	CCCGACTCGAGTAGTCATTATT T	38422	38871
psaB-psaA-1	CTATATTCACCGGGCCAAGA	CTCAGCCTAGAGCCTTGAGC	39234	39723
psaB-psaA-2	CTATATTCACCGGGCCAAGA	ATGTGACGGTATTGATACTG	39234	40233
psaA-1	ACTACCCCAAACATCTGACTGC	GTAAACCGATATAGCACATCATC A	40001	40997
psaA-2	AAACTGTGGAAGCCTAGAAATAT ACA	GTAAACCGATATAGCACATCATC A	40509	40997
psaA-3	AAACTGTGGAAGCCTAGAAATAT ACA	ACTCACATTGGACCTAGTGC	40509	41542
psaA-IG-1	CCAAGTCCTAGTAGCCCTGC	AAATAGGCTACATTTCGGAACTT AAT	41241	42202
psaA-IG-2	TGGTAGTATCAGGTCCCTTAGCT ATT	AAATAGGCTACATTTCGGAACTT AAT	41728	42202
IG-ycf3ex3	AACCTAATCGAGTGTATTCATAT TTCA	AGCACAGAATTGGTTGACGA	42147	42623
ycf3ex3-in2	AACCTAATCGAGTGTATTCATAT TTCA	AGCACAGAATTGGTTGACGA	42574	43050
ycf3ex3-in2-ex2	TCCAATACTCAGCGGCTTG	TTCGGGCATTAGAACGAAAC	42661	43591
ycf3in2	AAAGCATGTCCACTGTTATTAGA TATTAGA	AGGGCTTTCTACATAAGCATCG	43028	43455
ycf3ex2	CGATGGATGAAGTTTAGTTATTT GC	TTTCATTATGCACCTAAAGGAGG	43384	43848
ycf3in1	AACGAACTCTCCGTTTCAGAAC	TTTACCTATGGTTCCCGTATTACA	43775	44272
acf3ex1	CCCTATGCCTCCTATTCGTATATT	AGTTCGTAATAACAATTCCTTT GTTTG	44202	44686
S-GGA	TTTCTCACAACAAAGGAATTGT AT	TTCATGTATCATAGATTGGTAGG GA	44652	45104
rps4-1	GGGAAGAGCAAACAAGGGAT	GCTTGGACTATTCTCAAGCG	45053	45528
rps4-2	GTCCATGATTAATAATTGGCG	TCTTTGTATTCCAATAGTGGAGT GTATT	45486	45936
T-UGU	ACTGAACTAAATGATAATGATAA ATGACG	TTGATACGATCTAGTAGTTTAGT GAATTTG	45877	46338
T-IG	CTCTGAGCTAAGCGGGCTC	TTTGTATTTGCAATTCAATATGGT T	46269	46732
L-UAA ex1-in	TCGACCGTTCGACTATTTCTG	TGAACACAAGGTAGTGAACTCCA	46632	47129
L-UAA in-ex2	AAGGGATAGGTGCAGAGACTCA	GGGATAGAGGGACTTGAACCC	47065	47488
L-UAA ex2-IG	AAATCGTGAGGGTTCAAGTCC	TTTCAGTCCTCTACTAATGGTGA CA	47459	47872
F-GAA-1	CCTTCGGTAATGGTCGACATAG	AAATCCTCTGCCAAGAACCA	47798	48255
F-GAA-2	CTCAGTTGGTAGAGCAGAGGACT	AAATGAGCCAATAGGATGAACT AAA	48185	48668
ndhJ	TTGACTAAGTTATGTGCGCGA	TCGATTATCAAGGAATAGAGACT TTACA	48593	49092
ndhJ-ndhK	AAATTACAGCAATAGAATGCCA AT	CTAAACCAGAGGCTGTTATAGAC G	49027	49513

ndhK	TTCGATCCTTATAGATTCTCTAGCTATT	TTATGAATTCCATTAAGTTTCCC A	49439	49936
ndhK-ndhC	TCATTTAACGTAGTTGAAATAACGGA	TTTACTAATATCAAGTGCTATTCTGTTT	49864	50325
ndhC-IG	TCCGGAAATTAGAAATGCCA	AAGATGAGTATGGTAAAGTCTTACTGGA	50277	50737
IG ndhC-V-UAA	AAATCCAGTAAGACTTTACCATCTCATC	TTTGTATTCTTTATTTCTAACAGGTTACTTT	50707	51132
Vex2-in	CAGGACTTATGGTTTATGATATGGAA	AAAGCAAACCTACGTCAAGAGAA	51051	51481
Vin-ex1	GAATTCTAATACAATACAGAAGA ACTACCAA	AAATGTGTATCACAAACACAAG GG	51411	51891
Vex1-atpE	AAACTTTGGCGCACGTGTA	CTCTCAGACGAGCTCGGACA	51819	52311
atpE-atpB	CAAATCGTATTGAGAGCCTCG	TTACTTAGTGGGTAACATCGATGAAG	52266	52735
atpB-1	GTCATTTCTTCAATTTACTCTCA TTT	GCACCTGCCACCACATTT	52659	53145
atpB-2	ACCTTTGGCAGCTAATCCTCT	TGGTGTATCCGTATTGGTG	53077	53575
atpB-3	CTCGATTATTTCTAATAATTGCTGT	AACTAGGTTTCAGTTAGTTGAGCTTGA	53937	54360
atpB-rbcL	TTCAAGCTCAACTAACTGAAAC C	TTCTTCATATGTATAGCGCAAC C	54332	54766
rbcL-1	AAAGAAGTATTAGGTTGCGCTAT ACA	ATCAAGGCTGGTAAGCCCAT	54731	55191
rbcL-2	TTTACCAAAGATGATGAGAATGT GA	ATACCGCGGCTTCGATCT	55552	56042
rbcL-3	GGAGTCAACTTTGGGCTTGT	AAAGATTGAGCCGAGTGCAA	55974	56459
IG rbcL-accD	TGTTGTGTCCACAAGAAATCCT	TTCCATAGAGCTTCTGGCCT	56601	57081
accD-1	TCTTAGCAATTGCATCGATATGT T	TCATCCGATATGAAATTGCG	56931	57319
accD-2	AAATTACAAGATAAGAATAAT AGGAATCG	AGAGGTAAACATTGATTGGTAGC AT	57671	58147
accD-3	TGGATGCAATTGTACCACGTA	AGAATCTGATCTAACAACAGGG AA	58453	58842
IG accD-psaI	TGCAGATCTATAGAGAGTCTTCC ATC	AAATGGGTACCTCAATTTAATAT TTGT	58774	59245
psaI	CTTTAGAATTCAGAATATAACAA TAACAGGT	TTACCTTAGGAGTAATTCATAGA ATTGTTTA	59188	59664
ycf4-1	TATAAACAATTCTATGAATTACT CCTAAGGT	CATAACCACTACCCACATTCCA	59632	60048
ycf4-2	TATGGGATCGCAGGTCTCTT	AATTTGAGACAAATAAACTCCT TT	59976	60475
cemA-1	AAAGGAGTTTATTTGTCTCGAAA TTAG	CGCATTGTCTAGTATCCACCA	60451	60873
cemA-2	TGGTTGATCTCTCTGCTGTAA	CAATCATTAGTCCCAACCGT	60801	61263
cemA-3	ATGTATCGGATTCCATTTCGC	AGGTATTTCTAGTTTGCATGGTC C	61220	61675
petA-1	TCGACCTAGCTAATTTATTGTAG GAAA	TTTATTGGGACGATAATTCTGAA A	61607	62088
petA-2	CGATCGTATTTACCCGAGA	TGGATCTTGAAGTACTATTTCG C	62019	62505
petA-3	CATTAACGAGTAATCCTAATGTG GG	TCAATTTCAATTGGTCAATAACG	62438	62864
IG petA-psbJ	GGGAACCATAAAATCGGCG	GGGTCCCCTTGAAGTACTGCTA	62961	63456
psbJLF	ACGTCTATAACTCAGCTCATCCA A	CATGGACTAGCTGTACCTACCGT	63511	64010

psbFE	GGTTTATCGTTGGATGAACTGC	AAATACCCTTGGTACTTTATTGACG	63939	64436
IG psbE-petL-1	CACTGAGATTGCATCTTTGTGAG	TTCTTGTCTGCAAATTAATTCC T	64387	64843
IG psbE-petL-2	TTTAAGGAATTAATTTGCAGAA CA	GAGGTATCCTACACGGAGAACG	64815	65177
IG psbE-petL-3	AATCTCGTTCTCCGTGTAGGA	TTGTGAATTATCAATCATTATAG GTGG	65151	65578
petL	GCCAAAGACGATGAATTGAGTT	GAGAGGTACTATCTATTCTAGC TCTAATC	65501	65958
petG-W-CCA	TCATTGAGATTCATTGGCAATAC	CGAGTCGGGTAAAGAATGC	65904	66367
P-UGG	AAAGGCTAGAAAGAGGGCATTCT	AGAACGATCTTATCGATTCCATT T	66332	66777
psaJ	GATAAGATCGTTCTAGTCGACAA TATTAAA	CCCCATTGTTGATTGTATCTCT	66764	67115
IG psaJ-rpl33	TTAGAGATACAATCAACAATCGG G	CGAACATCTTTACCCTTGGC	67092	67510
rpl33	AAGATTGAGGTGAATCATAAAATC CA	AGAATATCGGATTAGATTCTTT CTATTG	67452	67815
rpl33-rps18	GTTTCATGGCCAAGGGTAAA	GGGCAAACGCCTACGAA	67483	67976
rps18	TTATCTAGACGGGTGAATAGAGT GA	GGATTGGAAGAAATCCACGA	68055	68509
rpl20	CCCGAGCTCATTCTCCTTAG	TCAATGACTAGAATTAACGCGG	68451	68868
rpl20-IG	AAGCTTGATGCAAATAAACGAA	GGGATCTCATTGTGAAAGACCT	68795	69266
in1-rps12ex1	CTTGTAACAATTCACATTCTTTGGC	CAAGACAGCCAATCCGAAAC	69196	69693
rps12ex1-	ACATGTTCTCTGTCGCTGA	TTTATGAGGCACAAACGGGA	69623	70106
clpPex3-in2	GTGATGGTTTCGCGAAGTTT	TGAAAGAGTAGTATGAGATAAG GAAGAGG	70037	70510
in2-clpPex2	AAGTTTGTGACGCTGAAATGTG	TTTAGGCCAAGAGGTTGATACC	70431	70914
clpPex2-in1	AATAAGTTGATTGAGATTTCGG T	TTGGTTCATTGTCTATATGTGC	70872	71340
clpPin1	TTGCACATATAGGACAAATGAAC C	TCGATCGAGATATCCTCTGTTTC	71315	71760
clpPex1	TTTGCGCTTCGCGTTAC	TCCGATAAGTACCAATATGCAAT G	71688	72185
psbB-1	ACAACAATAGCTATCTTGGTTCA TAGA	CCCAAGAATTGGTTATTCCTAAA	72119	72596
psbB-2	CGGGAGGAATAGCCTCTCAT	TAGGCATGCGGCGTACA	72954	73451
psbBTN	TGCTAGAACCCTCTCAGAGATG	AGATCCATTCGAGGAACACG	73780	74276
psbNH	AAATATTTGGAGGCTGATTACGT T	AATTCAGTAAATCCATCCAG	74223	74704
psbH-petBex1-in	AATTCTTCTGTCTACTGGATGG AA	AAATACAAAGAAGCGTTTGTCTT	74668	75122
petBin	TTGGATCAAAGGACAAACGC	AATGCGAAAGCTCGTCTTTG	75091	75471
petBin-ex2	AACACAACATAAAGACGAATGA GC	TGATCGGATTAACCAACCAAA	75402	75896
petBex2	TGACTGAAGCTAACTTTGGTTGG	ACCTAGAATCTATATTATTTATA AGGGACCA	75862	76310
petBex2-petDex1-in	TGTTAATGCATTTCCTAATGATA CG	TGTTCCATCCCTTAATCTACTGG	76240	76701
petDin	TTTCTATGATCGTACCCGACG	CTCGAGCAAGAATTAACCAAAC	76629	77127
petDex2	TTTAGTTTGGTTAATTCTTGCTCG	AAGGGTACGGTTAATAATCCCG	77102	77527
petD-rpoA	GTCGTCCAGTAGCGACAACC	CCAATTAGAATTGCCTCCCA	77563	78060

rpoA	GGAGTTAAACTTCCATTGTCCA	GCGATGCGAAGAGCTTACT	78259	78749
rpoA-rps11	CATGTTCTTCTATTTGCGCA	GGAACACCCTTTGCTGCC	78709	79178
rps11-rpl36	GCATACCTTGATCCACTACTGCT	AAATAAGGGCTTCCGTTCTGT	79112	79598
IG rpl36-rps8	TCCTGCGGATTAGTCGACAC	CTTAATCACTTCCGAACGGC	79545	79923
rps8	AAATCGAACCATGCCGTTT	CGTAAGGAAACATCGCGAAA	79892	80332
rps8-rpl14	CTTTCTTATTTCTGTCTATGTCTTA GGG	ATCCACGCGGAATTGAGAC	80262	80761
rpl14	AATTGTCTCAATTCCCGTGG	TTTACTTCGTCCTTTGCATTAAA	80739	81110
rpl16ex2	CATTCAAATAGGTTTGTGGTTGA	TCTTCTCGTGGGAATCGTATTT	81037	81536
rpl16in-1	TAGATGTGATCCAAGCGGGT	ATTGAAAGAGTAAATATTCGCCG	81464	81962
rpl16in-2	CGCCGGCGAATATTTACTCT	CCAATTGGAAAAGTCTATGAGGT C	81937	82345
rpl16in-ex1	TTCTGAATGAATCTGTATTGATG CT	AAACTCCTTTGATATAATTGCTA TGC	82273	82674
rps3-1	TTTATCTTTTCTAATCCTAAACC AACGA	TTGAATTAACGAACAGGCGAA	82608	83037
rps3-2	TTCCGTCGATACGTCCTG	CCACTTGGTTTCAGACTTGG	82971	83464
rpl22	GGTTGTGCAAACCAAAGAGAA	ATGTCTGCCCATAAAGCACG	83406	83886
rps19	GCTTCTTCATAGGAACGTCCA	GAGAAGCTTAATACAAAGGCGG	83825	84226
rps19-rpl2ex2	TGGGTATAATGGTGGATGCC	TTACCTTCTGGAGAGGTCCG	84157	84642
rpl2ex2-in	CCAACATTTCCCACTTGTC	GAAGTATCGACGTAATTTCTAG AGTCA	84572	85071
rpl2ex2-in-ex1	CGGACCTCTCCAGAAGGTAAT	AAATGGGAAATGCCCTACCT	84623	85476
rpl2in-ex1	CGTTCCGTCATCTGGCTTAT	AAATGGGAAATGCCCTACCT	84998	85476
rpl2ex1	TCCAATTACGTAAATCAAATAGT TCAA	AACCGGGTTATTCTATTCACC	85419	85905
rpl23-I-CAU	AAGAGGTGGAATAGAATAACCC G	AATTCCTACTGGATGCACGC	85880	86328
I-CAU-ycf2	TTCCATTGATACAGAGCCAATTC	AATACGATATAGAAGGGCCGC	86259	86749
ycf2-I-CAU	TTCCATTGATACAGAGCCAATTC	CGAAGAGATCTTGGTGGAATTGC	86259	87461
ycf2-1	GAATTCGGGACAGCTATTCG	AACCTCCTTCAAGAATTGTCTTT G	87223	88435
ycf2-2	TTTCTCTGACAGATGGTCAGAAC T	AACCTCCTTCAAGAATTGTCTTT G	87961	88435
ycf2-3	CGATCAACCAACATTTATCG	ATCGAGTAAATAGCTCTACG	88800	89916
ycf2-4	TCACTATCTTGTTCAATTCAC	AATTGTTCCAGAGCAACTAG	89688	90750
ycf2-5	TATCGACACATCTGAGATCG	ATCATAGTTAGAAGCTCCAG	90486	91626
ycf2-6	TTTAGTGATAGGTTCTATAGG	GATCATTATCAAAGTACTGC	91405	92558
ycf2-7	GTACAAAATGGTACTTCGAGC	TCCACTTAATCCCTATTTTCATGG	92308	93428
ycf2-8	AGGTCTTCCAAAGAACAAGGC	TCCACTTAATCCCTATTTTCATGG	92930	93428
ycf2-IG	ACAGGAGAAGGGTTCCCAT	ACAATTAGAATTAGGCTCGGTCA	93363	93838
IG-L-CAA	CCCTATATGGATAAGACACATTC CA	GAATAAGTTCGGCAGCGGAT	93789	94262
L-CAA	CCATTCATTAGATAGAGAAGATC GC	TCCCTACGTCGTTACATTCCA	94206	94691
ndhBex2-1	AGGTCAGATTTGCGCTATTCC	TGACTGGACGAAACCAAGAA	94640	95116
ndhBex2-2	TTCTATAATTCGCATGTGAGGG	TCATTGCTATTACTCAAACAAGC A	95069	95545

ndhBex2-in	TCCGATTTGACCTATGGACG	GTGCTCCTACGGAACCAAGG	95481	95969
ndhBex2-in-ex1	CCAGAAGAAGATGCCATTCA	TCATCAATGGACTCCTGACG	95582	96418
ndhBin-ex1	GGAATCCTTCATCAGTGGTTG	GAAGGAGTGC GGTTCTGTTT	95899	96393
ndhBex1-1	TCTCAGAGATAGATAGAGAGGT AGGAATTT	CATTGAATGTACAGAAATGGCTA TAA	96342	96811
ndhBex1-2	AAACATTCCTCCTAGAGTAGCTG TTAAT	TTCCGTAAATATTCCATTCCAAA	96739	97234
IG-rps7	TCATGAATTAGTAACTGCATCCA A	CACTTGCCATTTCGTTGGTTA	97161	97653
rps7-rps12ex3	TGAAAGCCATATTTTCGACCC	CGTATGTACGGTTTGGAGGG	97591	98076
rps12in2-ex2	CCCATATTGTAGGGTGGATCTC	CTAGAAACATGTGAAGTGTATGG CT	98017	98505
rps12ex2	GTCTCGTGGTAGCCTGCTC	GAGGAGATTTCGCGAACGA	98430	98923
rps12in1	ACCTCATACGGCTCCTCGTT	AATCTGATTGAATTTATTTCTGTA CCC	98855	99352
IG rps12-V- GAC-1	TTTCTCATTGAGCGAAGGG	CGGTTCCGTTGCTACTGC	99310	99749
IG rps12-V- GAC-2	GATCCGATCAATTGCGTAAA	TCATAGTAATAGAAATACATGTC CTACCG	99708	100124
IG rps12-V- GAC-3	AGTCCTACATTTTGTCTCTGC	CTATTTCCAAAGGAACTGGAGTT AC	99882	100309
IG rps12-V- GAC-4	GACATGTATTTCTATTACTATG	CGGAAATAGGATTGACTACG	100102	100540
IG rps12-V- GAC-5	AAATAGGAAGATCTTTGGCG	ATCCTAAGTCAAAGGGTCGA	100304	100681
V-GAC	AGATCGGGAGAATCGTACGG	TCATAACTTGTATCCATGCG	100470	100940
V-GAC-16S	TAACTCAGCGGTAGAGTGTC	TACGCGTTACTCACCCGTCC	100716	101121
16S-1	ACTCCATGCGAATATGAAGC	TCTCAGTCCCAGTGTGGCTG	100902	101309
16S-2	GCTCGCTCTGATTAGCTAG	CATGTCAAGCCCTGGTAAGG	101214	101958
16S-3	GAAAGCACTCTGCTGGGC	GTCGCCAGGGCATAAG	101686	102185
16S-4	TGGAGCATGTGGTTTAATTCG	CTGAAAAGGAGGTGATCCAGC	101903	102506
16S-5	AGTTCCGATTGCAGGCTGC	GGGGGCCCGCTATGCCAAGC	102258	102781
I-GAU ex1	ATTTAGGTTTGACACAGCTTC	CCACATCTCAGGGTCAGGCG	102529	102921
I-GAU ex1-in	GCACGACGGGCTATTAGCTC	GAGTCAAGAGATAGATAACATG	102794	103302
I-GAU ex2	CTTATCAGTGTATGGACAGC	GGCCATCTGGATTTGAACCAG	103116	103599
I-GAU-A-UGC	AGAGTTGTATGCTGCGTTCG	CCAACCTACCGTCCATGTACG	103466	103924
A-UGC ex1-in	TGCATGCTCCACTTGGCTCG	CCTACGGGGTGGAGACGATG	103645	104093
A-UGC -in	GGTCAGATCTAGTATGGATCG	ATAGAGGCCAACGATAGACAAG	103886	104460
A-UGC ex1	GTTCTGGTTCTCCTGTAGC	CCTTAACTTTAAGGCTATGC	104286	104684
A-UGC-23S	GCGGTGGTTTACCCTGTGGC	CCGCTTCGCTAGCAGCACG	104487	105004
23S-1	GAACTGCTGCTGAATCCATG	AAGCCACTGCCTATGAGTCG	104822	105303
23S-2	CCGATAGCGAAGTAGTACCG	GTCATATCTAGTATTCAGAG	105146	105630
23S-3	GGAGGTCCGAACCGACTGATG	CCCACAGCTTCGGCAGATCG	105426	105881
23S-4	GGGGATAAGCTTCATCGTCG	ACCATCTTTCGGCTAACCTAGC	105671	106168
23S-5	AGCGAGAATGTCGGCTTGAGT	ACGACTTTGCGGAGACCTGTG	105958	106509
23S-6	GAAACCGACACAGGTGGGTA	CCTTCCACCTAAGCTGCG	106334	106833
23S-7	ATAACGGTCCTAAGGTAGCG	GGTGGGTCTTGACAGTCAAGC	106621	107068

23S-8	TCAGTGAGATACCACTCTGG	GATAACTGGTACACCAGAGG	106868	107407
23S-9	GGTACGTGAGCTGGGTTCAG	AAGTCTACCGGTCTGTAGG	107277	107697
4,5S	AGAGCCTCCGGTAGCACAGC	TCATCATCCTGGCGTCGAGC	107515	108074
R-ACG-1	CTTTGGTGTCCACTCCAGTC	TCCGCTATCGCTATCCCG	107860	108448
R-ACG-2	GGGCTTGTAGCTCAGAGGATT	TCTTTGATGCAGTCATCGATT	108302	108758
N-GUU-1	ATTCATATGTTTGCTCGCGG	GGGTTACGAAGGAACTTCGAG	108698	109167
IG-yefI	AGATCTCATAGAGTTCAATTCCCG	TGATACTTTCTTCTCGGTTCCCTTC	109098	109593
3'ndhF(yefI)	TTGTTGGTTGGTTAATTGGTCA	TGTTCGAACGTGGAATTCAT	109928	110340
ndhF-1	TGAAATGGAAGAAATCCGAGT	TTTGTATATAATTGGTCATATAA TCGTGG	110271	110673
ndhF-2	TGAAATGGAAGAAATCCGAGT	CCGCATGAATCAGACAATAC	110271	111021
ndhF-3	AAAGGTTTATTGACGGCGTG	TCCCATTTCCGGCTCTTATACA	110874	111865
ndhF-4	TCATTAAGAATTCATCTTTCCGAC	TCCCATTTCCGGCTCTTATACA	111371	111865
ndhF-5	GGTATCCTTGATCATGCGACATA	TCAATATTCATGGATCATCCCTTT	112275	112624
ndhF-IG	AAAGGAGAAGTCCAACCTCTAGT AAA	TTTGTCTGGGAAATCTTTGTTC	112554	113007
IG ndhF-rpl32	AAGAATAGAACAAAGATTTCCACGA	AATTTCAAGTGGTATAATTGGATG TCA	112979	113433
rpl32	TGTCTTTGACATCCAATTATACAC	TGTCTCAAGGTAGTGATGGGAA	113402	113792
IG rpl32-ccsA	GGGATTCGTATTGTTCCTATC	AATTAAAGTAGTTGGAACCTCAA CCC	113758	114107
IG-ccsA	TTTGTCTTTGGGTTGAAGTTCC	TTGTCAGCACAAATTGAAACGA	114073	114530
ccsA	GGTTAATGATGCACGTAAGTATGA	AAACCGATCAAAGCCACAAT	114873	115365
ccsA-ndhD	GGTATAAATTCTGCAATTGTGGC	CCCGAGAGTTATTTCTTTCAATC	115331	115792
ndhD-1	AGCGCCAATAAATCCATGAG	GTTCGAACGAACCAACATTAAA	116139	116602
ndhD-2	AATAGTATTTCAGGTGAACAGG ATAGGA	TGGACGATCCATTAATTCAACT	116530	116998
ndhD-psaC	TCGATCCATTTATAATCTTCGGA	GACTGTGTGGTTGTAAGAGATG TG	116953	117425
psaC-ndhE	CATGCCATAAATAAACTCGAACG	AAATCAATTCGCATAAACCAATC	117350	117845
ndhE	AAGGTCGATTGGTTTATGCG	TCTAGTTGATGGAATCCGGTG	117817	118178
IG-ndhG	CATTAGCAACTCCTTATCAATT T	CTCGATACGTCATGGTACGG	118107	118562
ndhG	CTTATTAAATCTTGCTCTAGAAT CTGGTT	ATAATGGATTTCCTGGACC	118492	118910
ndhG-ndhI	ACTAGAAGACCGGATCCGAGA	TGGGTCGTTTACCAATGTCA	118846	119338
ndhI	TTTGTTTGAGGTGAATTCCAAA	TGCTTCCTATGATAACCGGG	119269	119761
ndhI-ndhAex2	ACCAATATACCTGCAGCTCG	GTTGCTTCTTATCTAAATCTATTA ATTTC	119694	120158
ndhAex2-in	GGAATAGAAATATTCCAACCGC	GAATTTGAGCAGACAGAATTCCA	120079	120576
ndhAex2-in-ex1	TTGACGCCACAAATCCAT	TTAGGTGGTCTGCGAGCTG	120297	121535
ndhAin-1	GGGTCCCGAATTATACCAATG	GGGCTTTAAATTAGTAGAAATGA TCAGA	120535	120969
ndhAin-2	ATTGTGCGGTGGATAGGAGC	TGTACAAAAGTTAAACGGAAAT AAA	120891	121261
ndhAin-ex1	GGGTAAAGTGATTCTTACACTTA TGTTTATT	TTCAGTAATTCCTTTAGCAATC A	121212	121671

ndhAex1-ndhH	AAATACCGATATTGAGATCCGC	TGAAATTGGCTGATATTATGACG	121616	122078
ndhH-1	AATAACGAGCTAATGAATCTCCT TG	AAAGGGCCAGCTATATCAGAGT	122409	122906
ndhH-2	GCCGAGCCATAACAGATGAG	TTCAGAAATCTAATTCATGCCAG A	122836	123235
rps15	TTCCTGTAAGTGGTCTCTTCATAA GTT	AAATATAGTCATTTCAATTTGAAG AACAAA	123171	123554
rps15-IG	CCAGCAGTCGTTGACGTTT	TGCACAAATATGAGGGATTGTT	123376	123829
ycf1-1	AACAATCCCTCATATTGTGCAT	AATTATGATTTCTTTGTCCCTGAA A	123808	124219
ycf1-2	AACAATCCCTCATATTGTGCAT	TGATTGGATGGGAATGAATG	123808	125051
ycf1-3	TCTACTTGACCGGCCGATTC	CAAGAATGAAGAAAATGGAG	124779	125900
ycf1-4	AATGAAAGATTCCGTGTCTTG	AATTTCAAGCATCTCAGAAGGC	125641	126660
ycf1-5	TTCGCTAAGTGAAGAATTTGTCC	AATTTCAAGCATCTCAGAAGGC	126215	126660
ycf1-6	TTCGCTAAGTGAAGAATTTGTCC	ATAAAGAGCCACATGGCGAG	126215	127311
ycf1-7	TTAGCCCCCATATATCAAACG	ATTGTAAGAAATGAAATGTCAC	127063	128119
ycf1-8	ACAGACCATTCTTATCTAAAGC	CTTTTATACTAGGTAATCTAG	127863	129228
ycf1-9	ACGGTAGAGCTAGGACAGTTATT G	TTAATAGGGAACCTCAAAGCG	128944	129443
N-GUU-2	TGAATGGAATTGGGATATGGA	AGGACTATAGAATAAAGGATTAT CCCG	129381	129837
IG N-R	CTGTGATATTTGAGAATCACCGT C	GAAGGACCTTTCCCTCCG	129769	130257
18S	AAACGGCTACCACATCCAAG	TCAGCCTTGCACCATACTC	Chromo-	

Tabelle 4 Sequenzen der für die Erstellung eines Oligonukleotid-Arrays verwendeten Oligonukleotide sowie ihre Position innerhalb des Arabidopsis- Chloroplastengenoms.

Oligonukleotid	Oligonukleotid-Sequenz	Genom- Position: Start	Genom- Position: Stop
rps14	TTTCCAATTTTGCCCTCTCTTCTCCCTATAAATCAAACTTTCTTT GC	37188	37237
rsp14-psaB	AATAAATATAAGAGTGCATACCTATATTTTTTTTATTAATAAAAAAAT ATAT	37300	37349
psaB1	TTAACCGAATTTGCCCGATGTGGAGGCAATCAAGAAAGCCGCATA AGTGA	37375	37424
psaB2	ATATCCATTGATAAGTTGTGAAGAGTTAACCATAGATAATCTCTT AACC	37675	37724
psaB3	TACTAAGATCAATGTAGTTGTATGTAAACCTAAAGCAATAGCATG ATGAA	37975	38024
psaB4	TCCCAAAGTATGGAACCCTAGAAAGAGGCTGGCCCAACTTAAATG GGATA	38275	38324
psaB5	GCCTAATTGAAAATGAATCGAATTATTGATTGTGTCATAAAGACCC TTAT	38575	38624
psaB6	TTGAGCATAAAGATTCCACTGACCCGTAAAAAGTGGGCCTAACCC TTGGG	38875	38924
psaB7	AAGATCTTCATTAGTACGTAAACCGATTGTATACCACCACTGATAA ACAC	39175	39224
psaB8	ATCATGACTCTCGAAGTCATGTGCGGTAGCAATACCAAACCAAT ACGAC	39475	39524

psaB-psaA	TTGGCTAAACCTTGGAATCTTAATGCCATAATGCCTTTCAAATCC TCC	39550	39598
psaA1	TAGCCATTATCCTACTGCAATAATTCTTGCTAAGAAGAACGCCCAT GTT	39605	39647
psaA2	TGCCCATAAGAAATCGCGGAGCCACCCATTAATAGTAATGGAAC CTGTG	39905	39954
psaA3	ACCTTCAACAGTATCAATACCGTCACATGAATTGTAAATGCATGA ATAT	40205	40254
psaA4	ACCAAACTGTGGAAGCCTAGAAATATACATACCCAGTTGAGATG TGATA	40505	40554
psaA5	AGATAATTGAGCATGCCATGATGTTGTTAGAATTCATATAGGCCT TTAT	40805	40854
psaA6	ATAAAGTTGAGCCAAAAGATCCCGATTCAAGATAAATTCATGAGG AAGCG	41105	41154
psaA7	AGTTATTCGGATGCTCGCCAAATCTGAAAAAGCCTGAGGTTATT TGTA	41405	41454
psaA8	AGCATGTAGGTTCCAGATCCAAGTGGTAGTATCAGGTCCTTAGCT ATTG	41705	41754
psaA-IG	GAATAATCATTGAGTCCTCTCTTCCGGACAACACATACAAAGAA ACC	41848	41896
psaA-prom	CAAGTGTCGGATCTATTATGACATATCCATAGGGTGCTCAACGGA CCCT	42037	42086
psaA-410	ATTATCCTATTTCAATAAATGCTTATTAGTCATTACTAAGAAAAAG TCTA	42217	42266
ndhB-1	AAAAAAACCAATTTTTGATTTTTGGAATGGAATATTTACGGAATCC CCAT	97241	97192
ndhB-2	ATTCTCGTAGAATCGAGAATGAAATTTTCATTCTGTACATGCCAGA TCAT	97164	97115
ndhB-3	ATCGGAACAATAGGGCCGTTATGCTCATTACGAAACTTGTGAAG AGATG	96979	96930
ndhB-4	TTCCTCTAGAGTAGCTGTAAATATGAATAACAGAACTCTGTTAT AGCC	96793	96744
ndhB-5	TAGCCAAGAGAAACCATGAACCAGAAATAGAAGAGCTTGCCCCACC CATGA	96611	96562
ndhB-6	TCCTTCGTATACGTCAGGAGTCCATTGATGAGAAGGGGCTAGGGA AAGCT	96437	96388
ndhB-8	TAGAGAGGTAGGAATTTCTCAAACGAACCGCACTCCTTCGTATACG TCAG	96404	96355
ndhB-9	GCATGTCCATAGAGTTTTGAAAAATCCAAACATCTCAGAGATAGA TAGAG	96359	96310
ndhB-10	GTCAAAGTTCTGTCTTGGTCTGCGTGGGGATAGCATTCTCTCTGC ATG	96314	96265
ndhB-11	TTCGTTGTTCTGACCCTGCTTCACCTTAATTGTTATTTGAACAAGT CAA	96269	96220
ndhB-12	CCGTAATAACAACTTGCAAAATGGATCCGTTTATCATAAAGAGA TTCGT	96224	96175
ndhB-13	GTCTTCTGTATACGTCATTAGTCCGATCCTTTCAGGAACTACCC GTA	96179	96130
ndhB-14	TGAAGGATGAGAACCAACTATGTAGCATCTACATCGAGAATTCAA GTCTT	96134	96085
ndhB-15	GGTGATCCTTTTGTGACGGATGCTCTATTACACTCGTAGTCTCTG AAG	96089	96040
ndhB-16	ATCTGATTTGATTCTGTTCTCAATAGCCATGAGATTATCATCTTAGG GTGA	96044	95995
ndhB-17	CCTTGGTTCCGTAGGAGCACGTCCGAAAGATTGAGAAATGGAACC ATCTG	95999	95950
ndhB-18	CTTCATCAGTGGTTGTGAATGACTGATTTTTCTCAATCTTTTCGACC TTG	95954	95905

ndhB-19	TGTATAAGATCGAATCCTTTCTATTCTAAAACGGATTACTAATCC TTAA	95890	95841
ndhB-20	AGTGATAAAAGTAAAGAAGAACTCATCTTCTTTCTTTTGATTAC TTTC	95832	95783
ndhB-21	CAAAACCGTGCATGAGACTTTCATCTCGCACGGCTCCTAAGTGATA AAAG	95793	95744
ndhB-22	GTCAGAGTCGAAAAGAGGATTCCTCACTCTTCTCTCATTCAAAA CCGT	95752	95703
ndhB-23	TCCGATTGACCTATGGACGAATATGCAAGCATACGTTTCATGCTT GTTT	95530	95481
ndhB-24	GAGCTAAAGAGAGAGCCAAAAAAGGATCTTTTGTGTATAATCCTG CATAA	95331	95282
ndhB-25	TAATAACTTGATTATTTTAGATAATAGTAGATAGAAAGAACGCTC GTAA	95167	95118
ndhB-26	CTAGAAGCTAAAAAGGGTATCCTGAGCAATCGCAATAATCGGGT CATTG	94990	94941
ndhB-27	CATTTTGGGCGGAACCGATCTACTAATTCTTTGATTCCAGTTAGTA TTAG	94910	94861
ndhF-20	CTCGAAGTTTCCTTCGTAACCCCGGAACCTTCTCGTAGTGGCTCC GTTC	109146	109195
ndhF-19	TGTGATGGTTTTCAATCTTTTATACTAGGTAATCTAGTATCCTTAT GCA	109404	109453
ndhF-18	ACCACATTTCCATAGGGCCCTCTTATCTCTCTTCTCCGAGCTCG GGT	109504	109553
ndhF-17	GTTTTATTGCGGGACAGCTCATGATGTTTCATATCGATCTATTATGC GCCT	109604	109653
ndhF-16	GTATCTTTTGTTCATTCTTCTGGAACAATCACAAACACTTTTTTG ATT	109704	109753
ndhF-15	TTCCTGAATAATCTCATTTTTCAATTATTCAACCATTTCATTTTACC AAG	109804	109853
ndhF-VL	AGTCAACATTTATATGTTTCGATGCAACAACAAGATGTTATTTGTA ACAA	109872	109921
ndhF-14	AGATGTTATTTGTAACAAGTAGTTTGTGGTTGGTTAATTGGTCA CATT	109904	109953
ndhF-reifes 3'- Ende	GTAGTTTGTGGTTGGTTAATTGGTCACATTTTATTCATGAAATGG GTT	109922	109971
ndhF-13	GCAAAATAATTCTATTAGGTCTAATGTAGTTATTAGATCTAATAAG TAT	109995	110044
ndhF-12	CTCTTATTTATTACCTGTGTCTACTATTTAGGCAGAATACCATCACC CAT	110095	110144
ndhF-11	ACCAAGAGGTATCCACCGAAGAAGCTCTTTTCCTTCTCTTTTTTCG GAA	110195	110244
ndhF-10	TGGAAAAGACAAAATTAATAAGGATGATGAATTCCACGTTTGAAC ATACT	110295	110344
ndhF-9	AAGAAAATTCGAATTTAGAATTTTTCAAAATAAAAAAAAAAGAGG ATCAT	110384	110433
ndhF-8	AATTAAGTAAGGTTAAATTTAATAAAGATGAATAAAAAGGCTTAT ATAAA	110724	110773
ndhF-7	TTTTTATTAAGTTTTTTTTCTTCTCTTTACCCATAAAGAGAGTGA ATA	111170	111219
ndhF-6	GATCCTAAAAACAACAAAGCTTTCGAATAAGCATGAGTAATCAAA TGAA	111560	111609
ndhF-5	ATAGAAATGCACACAAAGTAAGGAATAAGAGATTTACTCTATTAT TTAAA	111942	111991
ndhF-4	ACATATAATTGTCACTATAAATCAGAACCAAAATCCCAACAGTTGT AATT	112293	112342
ndhF-3	TGATCCATGAATATTGATATGTATGTCCATAAAATAAAAAATCCT TTTT	112608	112657

ndhF-2	TTGTGATTTTATGCAAATACAGAAAAAGTGAATTATAATTCCATAT TACA	112909	112958
ndhF-1	GTACACTAAGTGAGCTTTTTTATTATATTTTTTAAGAAAGATTAC TAT	113127	113176
trnF	ATTTGAAGTGGTGACACGAGGATTTTCAGTCCTCTGCTCTACCAAC TGAG	106245	106294
IG trnS-trnL	CGGAATCGAACCGATGACCATCGCATTACAAATGCGATGCTCTAA CCTCT	46223	46272
psaJ	AATGCATCTGGAAATAAACGATTAATCTCTATTAATAAACCTGCTA ACGA	87441	87490

Tabelle 5 Sequenzen der Oligonukleotide, die für Edierungsanalysen verwendet wurden

Oligonukleotid	Sequence (5'>3')	Edierungsstelle
accD.AT.for2	ATTGCATTTGCGGGTAAAAGAG	<i>accD-2</i>
accD.AT.rev2	GGGAAATGCAAAAAGATGGAAG	
accD.AT.for	TTCATTTGTAGTGAAAGCGG	<i>accD-1</i>
accD.AT.rev	TTTCGCCTACTACGGATCCC	
ATPHfor2	ATAAGAGGAGATTGTATGAAA	<i>atpF-1</i>
AT7atpF	GTAATACGACTCACTATAGGGCTAATGGTACGTAAATGTAATC	
clpP.AT.for	GTAATGATCCATCAACCCGC	<i>clpP-1</i>
clpP.AT.2rev	TGAACCGCTACAAGATCAAC	
matK.AT.for	CGTTACCGGGTAAAAGATGC	<i>matK-2</i>
matK.AT.rev	AGCGGCGTATCCTTTGTTGC	
matK.seq	TTTGTGCCAGAATGCATCTTC	
ndhBfor2	TCATGATCTGGCATGTACAG	<i>ndhB-1,2</i>
ndhBedIII	ATTTCTTGAAGCTCAATCTCTCCCCGGAT	
ndhB1seq	TGAACCATATAGCCAAGAGAAACC	
nb11	TTCATGCTTGTTTGAGTAATAGC	<i>ndhB-3,4,5,6,7,8,9,11</i>
P12	GGTCTAATGAGGCTACTATG	
ndhBrev2	CTAAAAAAGGCTATCCTGAGC	<i>ndhB-10,12</i>
AndhB	GTCGTTGCTTTTCTTTCTG	
ndhB3seq	CAGGCAGGCCTATATTTCTTGG	
ndhDstart5'	GGTCCAAGTGATCTTGTC	<i>ndhD-1</i>
ndhD.AT.3rev	ACAGTTGAATTAATGGATCG	
ndhDstart5'	GGTCCAAGTGATCTTGTC	<i>ndhD-2</i>
iz	AGGAATTAATTCTAACTCCC	
ndhD.AT.for4	ACGGGATTTATTACTACTTTAGC	<i>ndhD-2,3,4,5</i>
ndhD.AT.for	CAAGCCTAATTCTATCATAACTCG	
ndhF.AT.for	AAAACCTTCGCCGCATGTGG	<i>ndhF-2</i>
ndhF.AT.rev	GCATTCGCTGCAATAGGTCG	
ndhGforM	TAGAATGGATTTGCCTGGAC	<i>ndhG-1</i>
ndhG.AT.rev	AGAATTATTGAAATGAGTTC	
petL.AT.for	AAATTTGGTAATTAACACGG	<i>petL-1</i>

petL.AT.rev	ATTCAATTGAACTTAGGG	
petLseq	GGTAATTAACACGGTAAGGAACATATCG	
psbF.AT.rev	CGTTGGATGAACTGCATTGC	<i>psbE-1, psbF-1</i>
psbE.AT.for	ACAGGAGAACGTTCTTTTGC	
pebEseq	CACCGGTTTAGCTTACGATGTG	
psbZ.AT.for	GCTTTCCAATTGGCAGTTTTTG	<i>psbZ-1</i>
psbZ.AT.rev	CCACCAAGAAGACTAATCCAATCC	

Tabelle 6 Sequenzen der Oligonukleotide, die für die PCR-Analysen zur Genotypisierung von cpRNP-Nullmutanten eingesetzt wurden.

Oligonukleotid	Sequence (5'>3')	Ziel-Gen
29A-1.for	TCCAGAGGACCAAGAAGTGGAGG	CP29A (At3g53460)
29A-1.rev	GAGGTGTGACCGCTCAAAATTGG	
29A-6.for	GCAGCAGCTCAACAGTTCAATGG	CP29A (At3g53460)
29A-6.rev	CTACGTTGAGAACCGTATCCACC	
31A.AD.for	ATCGGGATCCCAGACTTCGGATTGGGCTGAAGAAGGT	CP31A (At4g24770)
cp31.ex2.rev	TCCAAACCCACGACTCTGGTCAG	
cp31B.for	ACGCCTTGTTTCGTTCTCAGC	CP31B (At5g50250)
cp31B.revT	AAGACCTGAACGACAACCTCGTG	
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	<i>Left border</i> der T-DNA-Insertion (SIGnAL)
LB1	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC	<i>Left border</i> der T-DNA-Insertion (SAIL)
p745	AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC	<i>Left border</i> der T-DNA-Insertion für Wisconsin (WiscDsLox)-T-DNA-Linien

Tabelle 7 CP31A interagiert bevorzugt mit intronhaltigen tRNAs, CP29A zeigt keine Präferenzen. Alle PCR-Produkte des *Microarrays*, die eine tRNA beinhalten, wurden nach ihrer Position im Plastom aufgelistet, intronhaltige tRNAs sind hierbei fettgedruckt. Die differentiellen Anreicherungen (IP [Überstand/Präzipitat]/Kontroll-IP [Überstand/Präzipitat]) sind in einer Farbskala (gelb für schwache, grün für starke Anreicherung) dargestellt.

Name	differentielle Anreicherung CP31A	differentielle Anreicherung CP29A
Kint	4,12	1,10
Kint-Kex1	3,91	1,99
Q	1,44	1,74
Gex1-in	7,13	3,05
in-Gex2	2,40	2,25
Gex2-R	2,32	2,36
D	1,14	1,61
Y	1,35	1,98
E	2,53	2,50
IG E-T	2,02	1,78
T	1,88	4,54
G-fM	1,63	3,21
S-GGA	1,61	1,96
T-UGU	1,32	1,51
T-IG	0,81	1,20
L-UAA ex1-in	23,06	2,11
L-UAA in-ex2	3,23	2,35
L-UAA ex2-IG	12,25	2,61
F-GAA-1	4,64	3,05
F-GAA-2	3,76	3,10
Vex2-in	2,07	2,18
Vin-ex1	6,53	2,76
P-UGG	2,98	2,26
IG-L-CAA	5,65	2,46
L-CAA	6,25	1,97
V-GAC	2,37	1,51
I-GAU ex1	9,96	3,08
I-GAU ex1-in	11,27	2,37
I-GAU ex2	10,58	3,63
I-GAU-A-UGC	13,47	1,88
A-UGC ex1-in	12,95	2,66
A-UGC -in	21,44	4,22
A-UGC ex1	17,52	3,18
R-ACG-1	2,40	2,16
R-ACG-2	5,04	1,93
N-GUU-1	2,10	2,81
N-GUU-2	2,44	1,22
IG N-R	2,25	4,68

Anhang 2

Gen	Genom-Position	Col-0	cp29a	Gen	Genom-Position	Col-0	cp29a
<i>matK</i>	2931			<i>rpl23</i>	86055		
<i>atpF</i>	12707			<i>ndhB</i>	94999		
<i>rpoC1</i>	21806			<i>ndhB</i>	95225		
<i>rpoB</i>	23898			<i>ndhB</i>	95608		
<i>rpoB</i>	25779			<i>ndhB</i>	95644		
<i>rpoB</i>	25992			<i>ndhB</i>	95650		
<i>psbZ</i>	35800			<i>ndhB</i>	96419		
<i>rps14</i>	37092			<i>ndhB</i>	96579		
<i>rps14</i>	37161			<i>ndhB</i>	96698		
<i>accD</i>	57868			<i>ndhB</i>	97016		
<i>accD</i>	58642			<i>ndhF</i>	112349		
<i>psbF</i>	63985			<i>ndhD</i>	116281		
<i>psbE</i>	64109			<i>ndhD</i>	116290		
<i>petL</i>	65716			<i>ndhD</i>	116494		
<i>rps12</i>	69553			<i>ndhD</i>	116785		
<i>clpP</i>	69942			<i>ndhD</i>	117166		
<i>rpoA</i>	78691			<i>ndhG</i>	118858		

Abbildung 1 Analyse des Edierungsstatus aller 34 plastidären C→U-Edierungsstellen in *cp29a*-Mutanten im Vergleich zu Col-0-Pflanzen. Es wurden die Edierungsstellen überspannende PCR-Produkte amplifiziert und in selbst hergestellten Polyacrylamid-Harnstoffgelen mit Hilfe des ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer sequenziert. Das Auftreten eines Cytosin-Signals an der Edierungsstelle zeigt eine unvollständige Edierung. Aus dem Verhältnis von C zu T-Signal an einer Edierungsstelle kann die Stärke des Defekts abgeschätzt werden (Tillich et al., 2009).

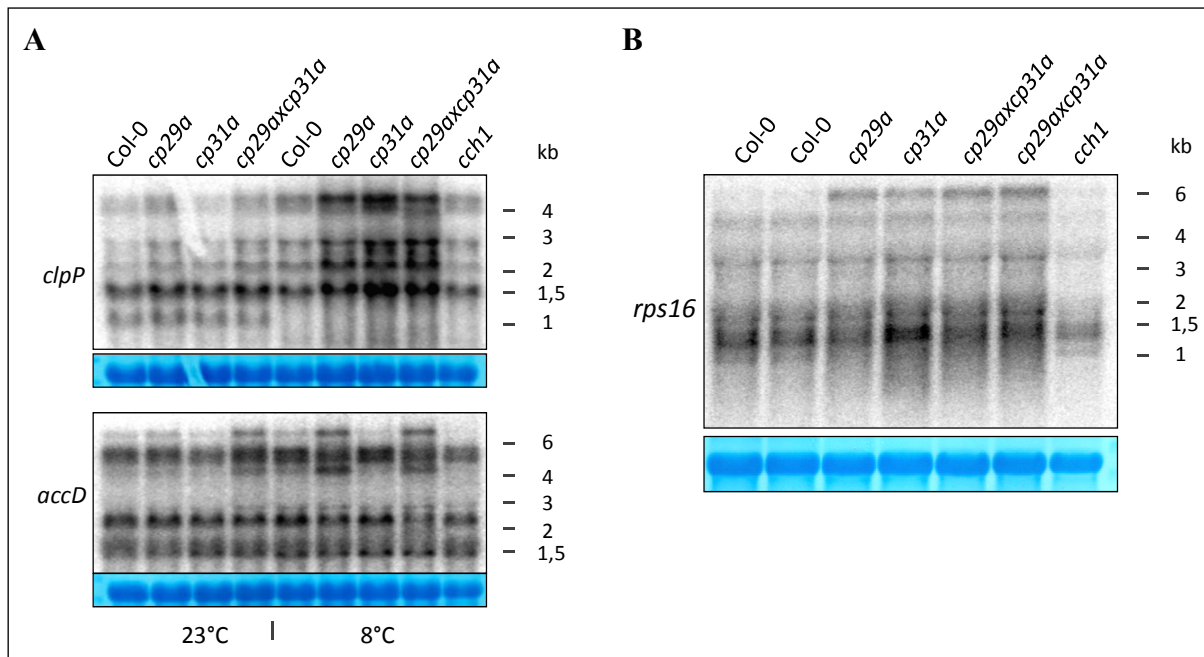


Abbildung 2 Northern-Analysen der *clpP*- und *accD*-mRNAs unter Standard- und Kältestress-Bedingungen (**A**) sowie der *rps16*-mRNA unter Kältestress (**B**). Ein Ausschnitt der Methylenblau-Färbung (28S rRNA) dient als Beladungskontrolle.

Abkürzungen

Molekularbiologische Begriffe

A	Adenin
A/BA	Acrylamid/Bisacrylamid
ATP	Adenosintriphosphat
C	Cytosin
cDNA	copy DNA
CK II	Casein Kinase II
CoIP	Ko-Immunpräzipitation
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Columbia-0
cpRNP	chloroplastidäres Ribonukleoprotein
CRM	<i>chloroplast RNA splicing and ribosome maturation</i>
CRR	<i>Chloroprespiratory Reduction</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DYW	Domäne einiger PPR-Proteinen mit charakteristischer Asparaginsäure-Tyrosin-Tryptophan-Abfolge
E	<i>extended</i> , Bezeichnung einer Domäne in PPR Proteinen
F	Filialgeneration
G	Guanin
hnRNP	heteronukleäres Ribonukleoprotein
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
IP	Immunpräzipitation
IR	<i>inverted repeat</i>
LK	leichte Kette (eines Antikörpers)
LSC	large single copy region (großer Einzelkopiebereich auf dem Plastom)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NDH	NADH-Dehydrogenase
NEP	nukleär kodierte plastidäre RNA-Polymerase, <i>nuclear encoded plastid RNA-polymerase</i>
NTP	Ribonukleosidtriphosphat

PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEP	plastidär kodierte plastidäre RNA-Polymerase; <i>plastid-encoded plastid RNA-polymerase</i>
PNPase	Polynukleotid-Phosphorylase
PPR	<i>pentatricon repeat</i>
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase PCR
RIP	RNA Immunpräzipitation
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RRM	RNA Erkennungs Motiv (<i>RNA recognition motif</i>)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
RuBisCO	<i>Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase</i>
SD	Shine-Dalgarno
SK	schwere Kette (eines Antikörpers)
SSC	small single copy region (kleiner Einzelkopiebereich auf dem Plastom)
T	Thymin
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
T-DNA	Transfer-DNA
tRNA	Transfer-RNA
U	Uracil
UTP	Uridintriphosphat
UTR	<i>untranslated region</i> (nicht translatierter Bereich)

Organismen

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>

Z. mays *Zea mays*

Chemikalien

APS	Ammonium Persulfat
BSA	bovines Serumalbumin
CO ₂	Kohlendioxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethanolsulfonsäure
KOAc	Kaliumacetat
KOH	Kaliumhydroxid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgOAc	Magnesiumacetat
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	standard saline citrate (Natriumchlorid-Natriumnitrat-Puffer)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBST	Tris buffered saline Tween 20
TE	Tris-HCl-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

Einheiten

° C	Grad Celsius
μ	mikro
C	centi
d	Tage
g	Gramm
h	Stunde

Hz	Hertz
J	Joule
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
M	molar (Mol pro Liter)
m	milli
min	Minuten
nt	Nukleotide
p	pico
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
s	Sekunden
S	Svedberg (Sedimentationskoeffizient)
U	<i>Units</i> (Einheit der Enzymaktivität)
UV	ultraviolett
V	Volt
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

Sonstige Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bidest.	zweifach destilliert
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d.h.	das heißt
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
HA	<i>Haemophilus influenzae</i>
s.	siehe
Tab.	Tabelle
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Christian Schmitz-Linneweber für die Vergabe des spannenden Promotionsthemas sowie die herausragende Betreuung bedanken. Es war sehr hilfreich, jederzeit die Möglichkeit für konstruktive Diskussionen auch außerhalb der Laborseminare zu erhalten, um Projektschwierigkeiten zeitnah lösen zu können.

Ein großer Dank gilt weiterhin der gesamten Arbeitsgruppe, in der ich mich immer sehr gut aufgehoben gefühlt habe. Besonders Sabrina Finster und Marlene Teubner, die immer ein offenes Ohr für mich hatten, sind mir sehr ans Herz gewachsen. Ein besonderer Dank gebührt Hannes Ruwe, der es irgendwie schafft neben seiner eigenen Promotion die ganze Arbeitsgruppe mit seinen Ideen zu bereichern und auch mir immer mit Zeit, Rat und Tat zur Seite stand. Ebenfalls möchte ich Sandra Gusewski für die technische Unterstützung im Labor während ihrer Zeit als Studentische Hilfskraft danken.

Ein Dank geht auch an die ehemaligen Kollegen Dr. Reimo Zoschke, Dr. Susanne Beick und Dr. Michi Tillich. Sie haben mir den Start in die Doktorandenzeit in einer sehr angenehmen Laboratmosphäre leicht gemacht.

Reik Modrozynski möchte ich für die tolle labortechnische Unterstützung in der Anfangszeit meiner Promotion danken, besonders für die Einführung in die Geheimnisse der erfolgreichen Stroma-Extraktion.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Ian Small, in dessen Labor ich die in dieser Arbeit gezeigten qRT-PCR-Analysen unter freundlicher Betreuung durch Dr. Etienne Delannoy und Dr. Sabine Kahlau durchführen durfte.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Börner, Dr. Julia Legen, Dr. Karsten Liere und Dr. Martin Meixner bedanken, die ihre fachlichen Kompetenzen jederzeit zur Verfügung gestellt haben.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern, meiner Schwester und meinem lieben Freund Henner, die nicht nur während der Hochs und Tiefs dieser Arbeit immer für mich da waren, sondern mich stets in allen Entscheidungen unterstützt und bestärkt haben.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt die vorliegende Dissertation mit dem Titel: „RNA-Bindestudien und funktionelle Analysen der chloroplastidären RNA-Bindeproteine CP29A und CP31A in *Arabidopsis thaliana*“ gemäß §7 der Promotionsordnung der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin (06/2012) eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Diese Arbeit ist keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt worden. Die Promotionsordnung der Humboldt-Universität zu Berlin ist mir bekannt.

Potsdam, den 28.11.2012

Christiane Kupsch